

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR

MARIANA DE MACÊDO COSTA BATALHA

**Estudo da expressão do gene da proteína ligadora de acil-coenzima A no
inseto *Tribolium castaneum***

Maceió/AL
2020

MARIANA DE MACÊDO COSTA BATALHA

Estudo da expressão do gene da proteína ligadora de acil-coenzima A no inseto *Tribolium castaneum*

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo.

Coorientadora: Prof. Dr^a. Katia Calp Gondim

Maceió/AL
2020

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

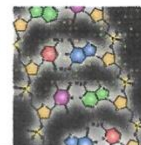
B328e Batalha, Mariana de Macêdo Costa.
 Estudo da expressão do gene da proteína ligadora de acil-coenzima A no inseto
Tribolium castaneum / Mariana de Macêdo Costa Batalha. – 2020.
 113 f. : il. color., graf., tabs.

 Orientador: Luciana Aparecido Meireles Grillo.
 Co-orientadora: Katia Calp Gondim.
 Tese (doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal
de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2020.

 Bibliografia: f. 107-119.

 1. Acil coenzima A. 2. Interferência de RNA. 3. *Tribolium castaneum*. 4.
Expressão gênica. 5. Insetos. I. Título.

CDU: 577.21:595.7




Ata de Defesa de Tese

Aos treze dias do mês de agosto de 2020, às nove horas, reuniu-se por videoconferência a banca examinadora composta pelos docentes Antônio Euzébio Goulart Santana (membro externo-UFAL/RENORBIO), Gabriela de Oliveira Paiva e Silva (membro externo-UFRJ), Hugo Juarez Vieira Pereira (membro interno), Melissa Fontes Landell (membro interno) e Luciano Aparecido Meireles Grillo (orientador) para a Defesa de Tese intitulada: “Estudo da expressão do gene da proteína ligadora de acil-coenzima A no inseto *Tribolium castaneum*” elaborada pela Doutoranda Mariana de Macêdo Costa Batalha, regularmente matriculada no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Doutorado, sob orientação do Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo e co-orientação pelo Profa. Dra. Katia Calp Gondim. Após a apresentação por 60 minutos, a doutoranda foi arguida pela banca. Em seguida, reunidos em sessão secreta às 13 horas, os examinadores consideraram a Tese APROVADA, emitindo-se o seguinte parecer:

APROVADA MEDIANTE CORREÇÕES SUGERIDAS

Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada às 13:20 horas e eu, Daniel de Brito Ricarte, servidor, lavrei a presente ata que será assinada pela banca examinadora e pela doutoranda. **Maceió, 13 de agosto de 2020.**

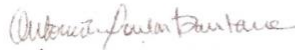
Presidente, Orientador (CPF: 014234237-80):


Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo
Coordenador do PPGCF/UFAL
SIAPE-4669568

Examinador 1 (CPF: 052095037-20): Prof.ª. Dra.



Examinador 2 (CPF: 118677606-49): Prof. Dr.



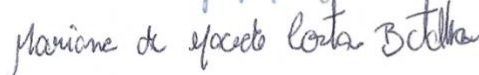
Examinador 3 (CPF: 906380690-68): Prof.ª. Dra.



Examinador 4 (CPF: 057040096-11): Prof. Dr.



Doutoranda (CPF: 084453524-90):



Folha de Aprovação

AUTOR (A): MARIANA DE MACÊDO COSTA BATALHA

Estudo da expressão do gene da proteína ligadora de acil-coenzima A no inseto *Tribolium castaneum*

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular.

Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo - UFAL (Orientador)

Prof. Dr^a. Katia Calp Gondim - UFRJ (Coorientadora)

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Gabriela de Oliveira Paiva e Silva – UFRJ

Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira - UFAL

Prof^a Dr^a. Melissa Fontes Landell - UFAL

Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana - UFAL

*Àqueles que sonharam com este
dia antes mesmo que eu me
entendesse por gente, meus
queridos pais, Paulo e Renalva.*

“É preciso de mais força para reparar do que para construir, para recomeçar do que para iniciar, para reconciliar-se do que para estar de acordo. Esta é a força que Deus nos dá”.

- Papa Francisco, 21 de Agosto de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço sempre a Deus, que me mantém segura e tão repleta de felicidade.

Aos meus pais, Paulo e Renalva, que são minha fortaleza, que me encorajam e me instruíram sempre a atingir minhas conquistas, com ética, respeito e sabedoria.

Ao meu esposo, Eduardo, que é o melhor presente de Deus, é o meu porto seguro. Te agradeço muito por tantas vezes ser minha sustentação.

Agradeço também as minhas irmãs queridas, Paula e Livia, que são de um amor tão especial! São o melhor sorriso, companhia e carinho.

Agradeço a toda minha família, que são a minha melhor torcida! E que mesmo sem entender muito o que faço, sabem que esse caminho é árduo, que me esforço bastante, e por isso torcem pelo meu melhor.

Agradeço pelos longos 10 anos de GRANDE aprendizado junto ao meu querido Orientador prof. Dr. Luciano Grillo, o qual sou imensamente grata por ter me formado mestre, doutora, professora e pesquisadora. E por tantos outros ensinamentos quanto pessoa e profissional.

Aos meus queridos parceiros e amigos de laboratório:

Josiel, Thomas, Camilla e João, com os quais tenho orgulho de dizer que formamos esse laboratório, e como o Prof. mesmo diz, estamos deixando um legado!

Em especial a Camilla, que foi sempre uma grande parceira e amiga!

Preciso também fazer um agradecimento especialíssimo a uma pessoa que entrou a pouco e já fez uma diferença tão significativa, minha amiga Meirielly que me ajudou a encontrar aquela motivação que estava quase perdida. Mesmo ela não acreditando em providência divina, eu digo que foi sim! E como sou grata por ter você como parceira de laboratório.

Agradeço também as nossas queridas ICs, Larissa, Luana, Érika, Thaís e Valéria que além da ajuda, sempre tenho uma troca de aprendizado muito significativo.

Assim como ao pessoal do Tecnano, sempre parceiros, Professora Camila, suas pupilas Valcilaíne, Thamires, Carol e Joy, e Prof^a Lígia, que sempre estiveram dispostas a ajudar, e por sempre fazer parte de um convívio especial.

À minha queridíssima coorientadora, Prof^a Katia, que foi uma honra e gratidão tê-la em minha orientação, bem como agradeço ao Prof. José Roberto por toda a atenção. Foi maravilhoso e engrandecedor os nossos curtos e intensos encontros. Gratidão sempre!

Imensa gratidão também ao prof. David, que nos pequenos grandes detalhes me ensinou muito e fez uma diferença gigantesca neste trabalho, e além disso, me acolheu tão bem em seu laboratório.

Agradeço também a todo o pessoal do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de insetos e do Laboratório de Alvos Moleculares, da UFRJ. Em especial a Fernanda, Pamela, Alessa, Rafael, Tainá, Igor, Gleidson, Iron, Samara, Bruno, Gessica, Larissa, Maria Fernanda, Daniela, Prof^a Isabela, e tantos outros que me ajudaram naqueles dias intensos. Só tenho a agradecer!

Agradeço também as minhas terapeutas maravilhosas, Agna e Maria Débora, que nesses últimos momentos foram essenciais, e ainda são.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN), que sempre posso contar desde o mestrado, em especial a Kelly, Thiago, Prof. Karlos, prof. Alessandro, prof. Euzébio e prof. Henrique, pelo acolhimento e ajuda de sempre.

Ao Prof. Daniel Gitai pela disponibilidade, acolhimento e orientação nos experimentos de qPCR. E à todos do LBCM por todo apoio e carinho, por tanto acolhimento, por estarem sempre dispostos a pensar junto e a fazer dar certo. Thalita, Mikaela, Bruna, Heloísa, Wanessa, Rafael.

Aos amigos do LAMP, Janaina, Dávida, Cláudio, Cledisson, Andréia e outros com quem podemos sempre trocar idéias e experiências boas, além de boas ajudas!

Aos laboratórios parceiros e professores responsáveis que cederam espaço e me acolheram durante os experimentos: LABI (Prof^a. Tamí Mott e Alex), TecNano (Prof^a. Camila Dornelas), LBCM (Prof. Daniel Gitai), LabTCon (Prof. Irinaldo Diniz), LAFA (Prof. Ticiano Gomes), Prof^a. Sâmia Andricia, LAMP (Prof. Hugo Juarez e Prof. Francis), Prof^a. Eurica Adélia.

Aos professores da Banca avaliadora, por toda paciência e valiosa contribuição.

Ao Instituto de Ciências farmacêuticas, onde construí toda minha formação.

Ao Instituto de Ciências Biológicas e Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL.

Pelo apoio da Instituição nucleadora, no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Ao CNPq, CAPES, Finep e FAPREAL pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Alagoas e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade de aprendizado.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para o sucesso deste trabalho.

RESUMO

As proteínas ligadoras de Acil-CoA (ACBP) são capazes de regular a disponibilidade de lipídios em meio intracelular para os vários processos metabólicos celulares, e constituem uma família altamente conservada. Portanto, suas funções podem estar associadas a um ou mais processos básicos comuns a todas as células. No entanto, seu papel preciso no metabolismo lipídico ainda não é totalmente compreendido. Portanto, o objetivo deste trabalho

é identificar as proteínas ligadoras de acil-CoAs (ACBPs) do inseto *Tribolium castaneum* através da caracterização da expressão gênica, em especial do gene denominado *TcACBP6*. Após identificação dos genes codificantes para ACBP nesse inseto, a análise da expressão foi realizada nos estágios de desenvolvimento e tecidos dos insetos por RT-qPCR. Para investigação da função do gene *TcACBP6*, foi realizado o silenciamento o qual ocorreu a partir da injeção de 0,15µg de dsRNA específico para *TcACBP6* em larvas. O efeito foi avaliado medindo-se o conteúdo de triacilgliceróis, análise de corpos gordurosos por microscopia confocal e medida de beta-oxidação. As larvas também foram submetidas à dieta hiperlipídica com 15% de óleo de oliva na dieta base e separadamente, 10% de tetraidrolipstatina (orlistate[®]), um fármaco inibidor de lipase pancreática, também associado à dieta base, sendo analisado em grupos isolados. O efeito foi verificado na análise da expressão gênica e conteúdo de triacilglicerol após 4 dias de tratamento. Dos resultados para a expressão dos genes *TcACBPs*, foi observado maior expressão relativa no inseto adulto e na larva, embora o gene tenha sido expresso em todos os estágios de desenvolvimento. Larvas silenciadas para *TcACBP6* mostraram inibição da expressão em 87%, caracterizando redução efetiva na beta oxidação e formação de um padrão diferente de gotículas lipídicas no corpo gorduroso, no entanto, não houve aumento no conteúdo de triacilgliceróis. No tratamento com alto teor de gordura, houve um alto acúmulo de triacilglicerol e isso foi associado à redução da expressão do *TcACBP6*. No entanto, um efeito contrário foi observado em larvas tratadas com tetraidrolipstatina. Com isso, conclui-se que existe uma relativa expressão desse gene no momento da transição da larva para a fase adulta, considerando uma importante função provavelmente na mobilização de ácidos graxos para a beta-oxidação.

Palavras-chave: transporte de acil-CoA; RNAi; inseto.

ABSTRACT

Acyl-CoA binding proteins (ACBP) act to regulate the availability of lipids in the intracellular region for the various cellular metabolic processes, and constitute a highly conserved family. Therefore, their functions can be associated with one or more basic processes common to all cells. However, its precise role in lipid metabolism is not yet fully understood. Therefore, the objective of this work is to identify the acyl-CoAs binding proteins (ACBPs) of the insect *Tribolium castaneum* through the characterization of gene expression, especially the gene called *TcACBP6*. After identifying the genes coding for ACBP in this insect, the expression analysis was performed in the developmental stages and tissues of the insects by RT-qPCR. To investigate the function of the *TcACBP6* gene, silencing was performed, which occurred from the injection of 0.15µg of specific dsRNA for *TcACBP6* in larvae. The effect was evaluated by measuring the content of triacylglycerols, analysis of fatty bodies by confocal microscopy and measurement of beta-oxidation. The larvae were also submitted to a high fat diet with 15% olive oil in the base diet and separately, 10% tetrahydrolipstatin (orlistate®), a pancreatic lipase inhibitor drug, also associated with the base diet, being analyzed in isolated groups. The effect was verified in the analysis of gene expression and content of triacylglycerol after 4 days of treatment. From the results for the expression of the *TcACBPs* genes, greater relative expression was observed in the adult insect and in the larva, although the gene has been expressed in all stages of development. Larvae silenced for *TcACBP6* showed inhibition of expression by 87%, which caused an effective reduction in beta oxidation and the formation of a different pattern of lipid droplets in the fatty body, however, there was no increase in the content of triacylglycerols. In the treatment with high fat content, there was a high accumulation of triacylglycerol and this was associated with reduced expression of *TcACBP6*. However, an opposite effect was observed in larvae treated with tetrahydrolipstatin. Thus, it is concluded that there is a relative expression of this gene at the moment of the transition from the larva to adulthood, considering an important function probably in the mobilization of fatty acids for beta-oxidation.

Keywords: acyl-CoA transport; RNAi; insect.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Filogenia de insetos holometábolos.....	6
Figura 2- Ciclo de vida do <i>Tribolium castaneum</i>	8
Figura 3- Análise de genes ortólogos de um conjunto concursal de 16.404 genes de espécies de insetos (<i>Drosophila melanogaster</i> , <i>A. gambiae</i> , <i>Aedes aegypti</i> , <i>T. castaneum</i> , <i>A. mellifera</i>) e vertebrados (<i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>Monodelphis domestica</i> , <i>Gallus gallus</i> , <i>Tetraodon nigroviridis</i>). Análise filogenética por máxima verossimilhança com o alinhamento múltiplo concatenado de 1.150 ortólogos de cópia única universal presentes em todos os organismos estudados.	9
Figura 5- Esquema do processo de digestão, absorção, síntese de DAG e exportação para lipoforina. AG = Ácidos Graxos; ACS = Acil-CoA sintetase; DAG = Diacilglicerol; TAG = Triacilglicerol; FATP = Proteína transportadora de ácidos graxos; Lp = Lipoforina; nLp = Lipoforina nascente; LTP = Partícula transferidora de lipídeos.	14
Figura 5 – Modelo de mobilização de lipídeos por hormônio adipocinético (AKH) e transporte para músculo de voo. AKH: hormônio adipocinético; AMPc: AMP cíclico; PKA: proteína cinase dependente de AMPc; TG: triacilglicerol; DG: diacilglicerol; FL: fosfolipídeos; LTP: partícula transferidora de lipídeos; LDLp: lipoforina de baixa densidade; FA: ácido graxo; FABP: proteína ligadora de ácidos graxos; HDLp: lipoforina de alta densidade; apoLp-III: apolipoproteína III. 19	19
Figura 6- Esquema geral de captação e transporte intracelular de ácidos graxos de cadeia longa em vertebrados.....	20
Figura 7 – Modelo para captação e transporte intracelular em insetos. O esquema enfatiza as possíveis etapas envolvidas na absorção de ácidos graxos (AG) no enterócito do intestino médio, a ação da proteína de transporte de ácidos graxos (FATP) e das proteínas de ligação intracelular, como a proteína de ligação a ácidos graxos (FABP) e a proteína ligadora de acil-coA (ACBP), além da síntese de diacilglicerol (DAG) e sua exportação da célula para a hemolinfa. TAG= triacilglicerol; Lp= lipoforina; R= receptor de lipoforina; LTP= partícula transferidora de lipídeos.....	22
Figura 8 – Efeito metabólico celular de ácidos graxos de cadeia longa e seu respectivo acil-coA.	23
Figura 9- Ésteres de Acil-CoA de cadeia longa como regulador do metabolismo energético, canais iônicos, tráfico vesicular e fatores de transcrição. Legenda: ACC= acetil-CoA carboxilase; ACS= acil-CoA sintetase; acil-SCoA= éster de acil-CoA; β -oxid.= β -oxidação; DG= diacilglicerol; ER= retículo endoplasmático; G= G-proteína ; GK= glucoquinase; PL= fosfolipídeo; PLC= fosfolipase C; R= receptor; T3= tri-iodotironina; TG= triacilglicerol.	27
Figura 10- Estrutura linear das sequências com o domínio de ACBDs humanos. Os domínios estão marcados em retângulos da cor verde (ACBP), rosa (domínio enoil-CoA hidratase / isomerase em ECI2), laranja (GOLD em ACBD-3), azul (fator acessório Herpes DNA replication- Herpes DNAp em ACBD4) e cinza (repetições ankirina no ACBP6).....	31

Figura 11- Semelhança observada por sobreposição das sequências proteicas das ACBPs de Humano (amarelo); bovino (azul); <i>Levedura</i> (roxo) e <i>P. falciparum</i> (marrom). (A) alinhamento da estrutura tridimensional realizado pelo programa PyMOL, (B) alinhamento múltiplo das sequências. Os aminoácidos idênticos (em preto) e semelhantes (cinza) são identificados por sombreamento. Resíduos marcados com * e ▼ representam regiões do sítio de ligação da ACBP.	32
Figura 12- Ilustração da ACBP e seu papel na célula. ACBP= proteína ligadora de acil-CoA; CTP= carnitina palmitoiltransferase ; FABP= proteína ligadora de ácido graxo.	33
Figura 13- Fragmento do alinhamento das sequências das TcACBPs através do programa Clustal ômega. São mostrados apenas os fragmentos onde há domínios conservados característicos da ACBP. As marcações indicam identidade (*), alta similaridade (:) e baixa similaridade (.).	61
Figura 14- Alinhamento das sequências de aminoácidos da TcACBP6 com ACBPs de diferentes espécies através do programa Clustal ômega. As marcações indicam identidade (*), alta similaridade (:) e baixa similaridade (.).	62
Figura 15- Resumo comparativo dos domínios nas sequências de TcACBP. Ilustração dos domínios de proteína identificados de acordo com pesquisa no CD-search. Domínios: de ligação de acil-CoA (ACBP); ankyrin (Ank); dinâmica do Golgi (OURO). Tamanho das sequências em resíduos de aminoácidos (aa).	63
Figura 16- Estrutura tridimensional predita para a TcACBP-6 através do programa de predição I-TASSER (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/) e visualizada com o programa PyMOL (software v. 2.0+). (A) Estrutura tridimensional da TcACBP-6 mostrando as quatro α -hélices preditas. (B) Apresentação da sequência de aminoácidos e em destaque, os aminoácidos importantes para ligação à molécula de acil-CoA. (C) Estrutura tridimensional predita em azul e em laranja o sítio de ligação para acil-CoA, assim como predito inicialmente para proteína de domínio ACBP (KRAGELUND et al., 1993, 1999). (D) Estrutura de átomos cheios mostrando as hélices em azul e os aminoácidos essenciais para a ligação em laranja.	65
Figura 17- Relação evolutiva da família de genes ACBP na Classe Insecta. A árvore filogenética foi inferida pelo método de “neighbour-joining” (p-distance) (SAITOU; NEI, 1987). As distâncias evolutivas foram calculadas pelo método da distância p com bootstrap de 1000 réplicas (NEI; KUMAR, 2000) e execução no programa MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). São mostrados próximos aos ramos os valores de bootstrap. O organismos adicionados são: <i>Anopheles gambiae</i> (Ag); <i>Apis melífera</i> (Am); <i>Acyrtosiphon pisum</i> (Ap); <i>Drosophila melanogaster</i> (Dm); <i>Danaus plexippus</i> (Dp); <i>Drosophila virilis</i> (Dv); <i>Pediculus humanus</i> (Ph); <i>Rhodnius prolixus</i> (Rp); <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Sc). Inclui a espécie <i>Homo sapiens</i> (Hs).	67
Figura 18- Expressão relativa do gene TcACBP6. Expresso em todas as fases de desenvolvimento do <i>T. castaneum</i> (A) e aumento da expressão durante a evolução da fase de pupa (B). Ovo; larva 20 dias (L20); recém pupa (P1); pupa final (P2); adulto 3 dias (A3). Os valores mostrados são a média e SD; * $p < 0.0001$, $n \geq 4$ (Student’s t test e ANOVA).	70

Figura 19- Expressão relativa do gene TcACBP6 nos tecidos do corpo gorduroso (CG) e intestino (INT) na fase (A) recém pupa (P1); (B) pupa final (P2) e de (C) larva 20 dias (L20). Os valores mostrados são a média e SD; * $p < 0.0006$ (C); * $p < 0.005$ (A/B), $n \geq 2$ (Student's t test e ANOVA)	71
Figura 20- Níveis de triacilglicerol em larvas tratadas com tetraidrolipstatina (Orlistate®) após 96h em comparação ao controle. Os valores mostrados são a média e SD; * $p < 0.005$, $n \geq 4$ (Student's t test).	74
Figura 21- Índices nutricionais da larva do <i>T. castaneum</i> após 96h de tratamento com tetraidrolipstatina (Orlistate®). (A) Aumento na RGR = Taxa de crescimento relativo e RCR = taxa de consumo relativo; e (B) redução na ECI = eficiência da conversão de alimento ingerido. Para análise estatística foi aplicado (A) 2way ANOVA e Student's t test não pareado, média e SD; * $p < 0.0001$, $n \geq 3$ e (B) Student's t test não pareado, média e SD; * $p < 0.0001$, $n \geq 3$	75
Figura 22- Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier (A); Peso médio de larvas tratadas com tetraidrolipstatina (Orlistate®) (0,1mg/mg de farinha) frente ao grupo controle (B). As barras representam média \pm erro padrão de 3 determinações. A análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA duas vias.	76
Figura 23- Expressão relativa de TcACBP6 nas larvas tratadas com tetraidrolipstatina (Orlistate®) após 96h. Os valores mostrados são a média e SD; * $p < 0.0001$, $n \geq 2$ (Student's t test).	77
Figura 24- Medida da atividade lipásica (A) reduzida no intestino e (B) aumentada no corpo gorduroso das larvas de grupo tratado com tetraidrolipstatina (Orlistate®) por 96h comparado com o grupo de larvas controle. As barras representam média \pm erro padrão de 3 determinações independentes. *: Significativamente diferentes por teste t, $p < 0,005$; **: $p < 0,0001$	80
Figura 25- Expressão relativa dos genes relacionados. Redução da expressão dos genes TcasILP1 (A), TcasILP2 (B) e TcasSK (C) em cabeça de larvas após tratamento com tetraidrolipstatina (Orlistate®), e redução da expressão gênica de TcasInR (D) em tecido de larva total após o tratamento. Resultados para grupo tratado por 96h em comparação ao grupo controle. As barras representam média \pm erro padrão de 3 determinações independentes. (*) Significativamente diferentes por teste t, $p < 0,0001$ para todos os testes.	83
Figura 26- Conteúdo de triacilglicerol nas larvas tratadas com dieta a 15% de azeite de oliva após 96h em comparação ao controle, apenas em dieta base. Os valores mostrados são a média e SD; * $p < 0.007$, $n \geq 4$ (Student's t test).	84
Figura 27- Índices nutricionais da larva do <i>T. castaneum</i> após 96h em dieta High fat. (A) RGR = Taxa de crescimento relativo (B) RCR = taxa de consumo relativo; (C) ECI = eficiência da conversão de alimento ingerido; (D) Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier; (E) Peso médio das larvas (mg). Para as análises estatísticas foi aplicado Student's t test não pareado, média e SD; * $p < 0.0001$, $n \geq 3$	86
Figura 28- Quantificação de espécies reativas a oxigênio (ROS) em tecido de corpo gorduroso das larvas após 7 dias de tratamento High fat em comparação como o controle não tratado (mantido em dieta base). A medida é feita por	

intensidade de fluorescência do estado oxidativo (DCF fluorescence) por unidade de fluorescência (U.F). Para as análises estatísticas foi aplicado Student's t test não pareado, média e SD; *** $p < 0.0004$, $n \geq 3$	87
Figura 29- Análise de desenvolvimento a partir das larvas até a fase adulta mantidos em dieta High Fat e comparados ao controle em dieta base. Para análise estatística foi aplicado (A e B) análise de correlação; (C) 2way ANOVA, média e SD; * $p < 0.0001$, $n = 3$; (D) 1way ANOVA, média e SD; * $p < 0.5$, $n=3$	88
Figura 30- Expressão relativa de TcACBP6 nas larvas alimentadas com dieta High-fat após 96h comparado ao controle. Os valores mostrados são a média e SD; * $p < 0.0001$, $n \geq 3$ (Student's t test).	90
Figura 31- Medida da atividade lipásica no corpo gorduroso das larvas alimentadas em dieta high fat por 96h comparado com o grupo de larvas controle. As barras representam média \pm erro padrão de 2 determinações independentes. $p < 0,05$	90
Figura 32- Microscopia de gotículas lipídicas do corpo gorduroso de larvas mantidas em dieta base como controle de análise comparatória (A) e de larvas tratadas em dieta hiper gordurosa (High fat) com 15% de azeite de oliva após 7dias. As gotículas lipídicas foram coradas com Vermelho do Nilo (Nile Red) e o núcleo com DAPI. Foram fotografadas a partir de seções óticas do corpo gorduroso e são visualizadas com leitura de barras de escala = 30 μ m.	92
Figura 33 - Histograma de tamanho representando a distribuição de tamanho das gotículas lipídicas do corpo gorduroso (A) e a representação da média e desvio padrão da frequência relativa das gotículas lipídicas (B) com análise estatística por Student's t test, análise unipareada entre os grupos; ****: $p < 0.0001$	93
Figura 34- Expressão relativa dos genes relacionados: TcasSK (A) da cabeça das larvas e TcasInR (B) em tecido de larva total após a dieta high fat por 96h em comparação ao grupo controle em dieta base. As barras representam média \pm erro padrão de 3 determinações independentes. (*) Significativamente diferentes por teste t, $p < 0,0001$ para todos os testes. (C) Conteúdo de açúcares totais na hemolinfa da larva em dieta high fat após 96h (ANOVA, $p < 0,05$).	95
Figura 35- Expressão de TcACBP6 nas larvas de <i>T. castaneum</i> por injeção de 0,15 μ g do dsRNA (dsTcACBP6), analisado após 3 dias em comparação ao controle não relacionado de dsMAL. Os valores mostrados são a média e SD; ** $p < 0.0028$ (Student's t test).	97
Figura 36- Expressão gênica de TcACBP6 nas larvas de <i>T. castaneum</i> silenciadas em 87% (A); Medida de β -oxidação (B), considerando o controle não relacionado dsMal. Os valores mostrados são a média e SD; significância em (A) * $P < 0,001$ e (B) * $P < 0,003$ (Student's t test).	98
Figura 37- Conteúdo de triacilglicerol normalizado por proteína (μ gTAG/ μ gPtn) na larva inteira (A) e corpo gorduroso (B) das larvas silenciadas após 3 dias da injeção de dsRNA para TcACBP6 em comparação ao controle não relacionado, dsMal. Os valores mostrados são a média e SD; (*): $p < 0.05$ (Student's t test).	99

Figura 38- Gotícula lipídica do corpo gorduroso de larva silenciada após 3 dias. Coradas com Vermelho do Nilo e com DAPI para identificação do núcleo. Foram fotografadas a partir de seções óticas de corpo gorduroso dissecados do controle (dsMAL) e de larvas silenciadas (dsTcACBP6). Barras de escala = 30 μ m. .. 100

Figura 39- Histograma de tamanho representando a distribuição de tamanho das gotículas lipídicas do corpo gorduroso (A) e a representação da média e desvio padrão da frequência de tamanho das gotículas lipídicas (B) com análise estatística por Student's t test, unipareada entre os grupos; ***: $p < 0.0008$. . 101

Figura 40- Expressão de TcasFATP/ACSL em larvas silenciadas em TcACBP6, comparado com o controle dsMAL. As barras representam média \pm erro padrão de 3 determinações. (*): $p < 0.01$ (Student's t test)..... 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Descrição sobre as fases de desenvolvimento durante o ciclo do <i>T. castaneum</i> sob condições ótimas (30-35°C e 80% de umidade relativa).....	8
Tabela 2- Lista de todos os iniciadores usados para PCR.....	41
Tabela 3- Eficiência de amplificação dos genes analisados por qPCR.....	43
Tabela 4- Sequências de iniciadores utilizados para síntese do dsRNA.....	49
Tabela 5- Sequência de proteínas homólogas à ACBP no <i>T. castaneum</i> . A tabela apresenta a nomenclatura adotada pelo autor, com seu gene específico e número de acesso pelo Genbank.	57
Tabela 6- Resumo da análise bioinformática das sequências de aminoácidos das ACBPs do <i>T. castaneum</i> . Estimativa de valores de massa molecular e ponto isoelétrico teórico (ProtParam); predição de sítio de fosforilação (Netphos 2.0 server); detecção de peptídeo sinal (SignalP 4.1); domínio transmembrana (TMHMM 2.0, SOSUI, TMPred e HMMTop).	59
Tabela 7- Relação das proteínas estruturalmente próximas à TcACBP6 pelo banco de dados do Protein Data Bank (PDB).....	66

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

20HE	20-hidroxiecdisona
ACBP	Proteína ligadora de acil-CoA
ACC	Acetil-CoA carboxilase
ACS	Acil-CoA sintetase
AGL	Ácido graxo livre
FL	Ácido fosfatídico
AKH	Hormônio adipocinético
ApoLp	Apolipoforina
CD36 plasmática	Translocase de ácido graxo associado a membrana
cDNA	DNA complementar
CE	Éster de colesterol
CoA	Coenzima A
Cq	Ciclo de quantificação
DAG	Diacilglicerol
DBI	Inibidor de ligação do diazepam
DGAT	diacilglicerol aciltransferase
dsRNA	RNA dupla fita
FABP	Proteína ligadora de ácido graxo
FABPpm plasmática	Proteína ligadora de ácido graxo associada a membrana
FATP	Proteína transportadora de ácidos graxos
FAZ	Ácido graxo sintase
FL	Fosfolípideo
G3	Glicerol-3-fosfato
GOLD	Golgi dynamics
GPAT	Glicerol-3-fosfato aciltransferase
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
HNF	Fator nuclear hepático
HSL	Lipase sensível a hormônio
ILP	Peptídeo semelhante a insulina
JH	Hormônio juvenil
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
Lp	Lipoforina
MAG	Monoacilglicerol
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PPAR	Receptor ativado por proliferador de peroxissomo
LC-CoA	Acil-coenzima A de cadeia longa
LCFA	Ácidos graxo livre de cadeia longa
LpR	Receptor de lipoforina
RE	Retículo endoplasmático
RNAi	RNA de interferência
RNAm	RNA mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT-qPCR	PCR quantitativo

SCP	Proteína carreadora de esterol
SREBP	Proteína ligadora de elemento responsivo a esterol
TAG	Triacilglicerol
TGL	Triglicerídeo lipase
RCR	Taxa de consumo relativo
RGR	Taxa de crescimento relativo
ECI	Eficiência de conversão do alimento ingerido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Insetos como modelo experimental	3
2.2 O modelo: <i>Tribolium castaneum</i>	6
2.3 Metabolismo de lipídeos em insetos:	10
2.3.1 Digestão, absorção e transporte	10
2.3.2 Estocagem e mobilização de ácidos graxos no corpo gorduroso	14
2.4 Transporte intracelular de lipídeos	20
2.4 O acil-CoA e seus efeitos no metabolismo de lipídeos.....	23
2.5 Proteínas ligadoras de Acil-CoA (ACBP)	28
3 OBJETIVOS	37
Objetivo geral	37
Objetivos específicos	37
4 METODOLOGIA	38
4.1 Insetos e manutenção da colônia	38
4.2 Busca de genes codificantes de proteínas homólogas à ACBP no <i>T. castaneum</i> . ..	38
4.3 Análise <i>in silico</i> das sequências proteicas de ACBP no <i>T. castaneum</i>	39
4.3.1 Predição de peptídeo sinal	39
4.3.2 Predição de Localização celular	39
4.3.3 Predição de sítios de fosforilação	39
4.3.4 Predição de domínio transmembrana	39
4.3.5 Estimativa de massa molecular e ponto isoelétrico	40
4.3.6 Predição de estrutura tridimensional (3D) da TcACBP-6.....	40
4.3.7 Análise filogenética	40
4.4 Síntese dos iniciadores.....	41
4.5 Determinação da eficiência dos iniciadores	42
4.6 Determinação da eficiência de amplificação e análise da curva de dissociação ..	42
4.7 Análise de expressão gênica nos tecidos	43
4.7.1 Extração de RNA total.....	44
4.7.2 Quantificação de RNA.....	44
4.7.3 Tratamento com DNase	45

4.7.4 Síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA).....	45
4.7.5 Reação de polimerase em cadeia (PCR).....	45
4.7.6 Eletroforese em gel de agarose.....	46
4.7.7 Reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-qPCR)	46
4.8 Análise dos dados	47
4.9 Dieta com tetraidrolipstatina	47
4.10 Dieta hiper-lipídica (<i>High-Fat</i>)	47
4.11 Controle de mortalidade	48
4.12 Índices nutricionais.....	48
4.13 RNA interferente (RNAi)	49
4.13.1 Síntese dos iniciadores com T 7	49
4.13.2 Produção do molde de DNA.....	50
4.13.3 Purificação dos produtos do PCR.....	50
4.13.4 Quantificação das amostras de DNA.....	51
4.13.5 Síntese de dsRNA.....	51
4.13.6 Injeção do dsTcACBP6 em larvas de <i>T. castaneum</i>	52
4.14 Medida de β -Oxidação.....	52
4.15 Quantificação de Triacilglicerol (TAG)	53
4.16 Quantificação da atividade da enzima lipase.....	53
4.17 Análise do estresse oxidativo	54
4.17.1 Permeabilização de mitocôndrias de corpo gorduroso.....	54
4.17.2 Produção estimada de espécies reativas de oxigênio (ERO).....	54
4.18 Visualização das gotículas lipídicas por coloração com vermelho do Nilo	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1 Busca dos genes codificantes de proteínas homólogas à ACBP no <i>Tribolium castaneum</i>	56
5.2 Análise <i>in silico</i> das sequências de ACBP no <i>T. castaneum</i>	57
5.2.1 Análise de predição bioinformática.....	57
5.2.2 Alinhamento e identificação de domínios de proteína ACBP.....	60
5.2.3 Predição de estrutura tridimensional	64
5.2.4 Análise de homologia por árvore filogenética.....	66
5.3 Caracterização da expressão gênica de <i>TcACBP6</i> por RT-qPCR em tecidos e estágios de desenvolvimento	68

5.4 Expressão gênica de <i>TcACBP6</i> em larvas condicionadas à um inibidor de lipase pancreática, tetraidrolipstatina (Orlistate®), avaliação dos índices nutricionais, TAG e expressão de genes relacionados	73
5.5 Expressão gênica de <i>TcACBP6</i> em larvas condicionadas à Dieta <i>High Fat</i> , avaliação dos índices nutricionais, TAG e expressão de genes relacionados	83
5.6 Inibição da expressão da <i>TcACBP6</i> por RNAi em larvas de <i>T. castaneum</i> e seus efeitos.....	96
6. CONCLUSÃO.....	105
Referências bibliográficas	107

1. INTRODUÇÃO

Proteínas ligadoras de acil-CoA (ACBP) constituem uma família multigênica de proteínas intracelulares de ligação lipídica que atuam regulam a disponibilidade de acil-CoAs de cadeia longa para os diversos processos metabólicos celulares (NEESS et al., 2015). As proteínas com domínio de ligação acil-CoA são altamente conservadas entre todas as espécies eucarióticas e ligam acil-CoA graxos de cadeia longa com grande afinidade e os protegem de hidrólise (FAERGEMAN; KNUDSEN, 1997; KRAGELUND et al., 1999; RASMUSSEN; ROSENDAL; KNUDSEN, 1993). Os acil-CoAs de cadeia longa em meio intracelular servem como importantes intermediários na biossíntese de lipídeos e degradação de ácidos graxos. Além dessas funções básicas, os acil-CoAs têm importantes funções na regulação do metabolismo intermediário e expressão gênica (FAERGEMAN; KNUDSEN, 1997). Portanto, o gene para ACBP, pela sua ampla gama de distribuição em todo o reino animal e vegetal e seu alto grau de conservação entre os diferentes tecidos e espécies, foi caracterizada como um gene *housekeeping*, que desempenha função básica e comum as células (FAERGEMAN et al., 2007; KNUDSEN et al., 2000). No entanto, apesar da ACBP estar associada ao controle crítico de acil-CoA, seu papel preciso no metabolismo de lipídios ainda não é completamente conhecido.

Alterações na homeostasia lipídica está constantemente associados à obesidade, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares, com isso, a caracterização dos mecanismos moleculares que coordenam a captação lipídica, a síntese e a mobilização da homeostase lipídica é fundamental para a compreensão da base dos distúrbios metabólicos lipídicos (SONG, WEI; VEENSTRA, JAN A.; PERRIMON, 2015).

Nos insetos, sob condições normais de alimentação, as células do epitélio intestinal absorvem os ácidos graxos digeridos da dieta e os convertem nos seus derivados esterificados à coenzima A antes da síntese de lipídeos complexos, como o diacilglicerol, o qual é transferido para a lipoforina, e através desta,

transportado para os demais tecidos (ARRESE et al., 2001; ATELLA, G.C.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, 2012).

O inseto *Tribolium castaneum*, modelo deste estudo, está em crescente aplicação em pesquisas de análise genética funcional de questões biológicas básicas, assim como a *Drosophila melanogaster*, devido em parte, à facilidade ao uso da técnica de RNA interferente (BROWN et al., 2009). O besouro *T. castaneum* apresenta um padrão de evolução bastante resistente sugerindo ser um modelo mais representativo no conteúdo e função dos genes em comparação com a *D. melanogaster*, tornando-se destaque para estudos de desenvolvimento de insetos (RICHARDS et al., 2008). Além disso, podemos destacar análises de interação gene-alimento, aplicáveis nesse inseto e com bastante relevância para avaliação de alterações metabólicas aplicáveis em vertebrados (GRÜNWALD et al., 2013). Além de análises de silenciamento por RNAi, que é um método útil para avaliar fenótipos por perda de função em muitos organismos, incluindo insetos (TOMOYASU; DENELL, 2004).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a expressão de um dos genes codificantes para ACBP em *T. castaneum*, nomeado *TcACBP-6*, com o intuito de investigar o metabolismo de lipídeos através do direcionamento de Acil-CoAs de cadeia longa para vias metabólicas e de sinalização intracelular. Analisando a expressão do gene em todas as etapas de desenvolvimento do inseto, regulando condições de dieta com alto teor de gordura e sob interferência de um inibidor de lipase pancreática, e através do silenciamento gênico compreender sua função.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Insetos como modelo experimental

Os insetos fazem parte do grupo mais numeroso e com maior distribuição no mundo, atuando com uma incrível variedade de mecanismos de regulação dos processos da vida (CHOWANSKI et al., 2017), o que caracteriza essa classe como representante de uma das mais importantes formas de vida no mundo (PEDIGO; RICE, 2014). Sua importância permeia diversas áreas, quer sob o aspecto econômico, ecológico ou sob o aspecto médico (CHERNIACK, 2010; LEHANE, 2005).

Estudos com insetos estão em constante aplicação na busca de modelos alternativos que possam ser fáceis de manter e infectar, além de passíveis de manipulação genética, e que permitam mimetizar aspectos de defesa de vertebrados após infecção (INSUA et al., 2013; RATCLIFFE et al., 2011). Existem vantagens que facilitam a manipulação com insetos, algumas delas são a ausência de intervenções cirúrgicas por não necessitar incubação para irrigação com oxigênio e por possuírem um sistema nervoso menos complexo, entre outras características que faz com que essa classe constitua um grupo de escolha para diversos tipos de estudos dentre eles, genéticos, bioquímicos, celulares e moleculares (GRILLO, 2005).

Muitos fatores contribuíram para o sucesso evolutivo da classe Insecta, como por exemplo, a manutenção de um ciclo de vida altamente especializado, sendo curto e rápido, um tamanho corpóreo pequeno facilitando a exploração nos diversos ambientes, e em sua grande maioria, hábitos alimentares diferentes. Além disso, um outro fator que contribuiu muito foi a presença de asas, que possibilitou a conquista dos ambientes mais diversos facilitando sua propagação no ambiente bem como sua proteção, pois possibilitou maior eficiência na busca do alimento e defesa contra predação, e garantindo o fluxo gênico das espécies através da migração (MARANHÃO, 1977; RATCLIFFE et al., 2011). Ernst e colaboradores (2015) afirmaram que esse sucesso evolutivo é também em parte devido ao alto grau em que ocorre o polifenismo, onde um

genótipo dá origem a mais de um fenótipo, ou seja, são fenótipos alternativos ambientalmente induzidos por especiação (SIMON, 2010) tornando os insetos uma das classes mais bem sucedidas na Terra.

Portanto, a partir de um modelo mais simples, os estudos utilizando insetos, podem gerar descobertas que podem ser aplicadas aos vertebrados, seja de forma direta, como um produto, ou insights sobre doenças humanas, além de fornecer conhecimento sobre os mecanismos biológicos. E ainda fornecer informações de importância ecológica como para aplicação de novas formas de controle biológico para insetos pragas. No entanto, ainda que muitos produtos oriundos de insetos sejam vistos como grandes fontes inovadoras, existem poucos produtos disponíveis no mercado (RATCLIFFE et al., 2011).

Dentro da amplitude de estudos que surgem a partir de várias espécies de insetos, podemos citar o uso deles como importantes modelos em estudos de biologia molecular. Por exemplo, a investigação epigenética tem sido promissora em insetos modelos na busca de mecanismos hereditários, na investigação da regulação gênica transgeracional e em doenças (MUKHERJEE; TWYMAN; VILCINSKAS, 2015). Comumente, alguns insetos tem servido de modelo para estudo da regulação epigenética, como nos gafanhotos economicamente importantes, *Locusta migratoria* e *Schistocerca gregaria* (ERNST et al., 2015).

A *Drosophila melanogaster* compõe um dos principais organismos modelo em estudos importantes como em citogenética e mecanismos que controlam o crescimento e a divisão celular em tecidos em desenvolvimento, e a demonstração da localização dos genes nos cromossomas (MORGAN, 2007). O sequenciamento do genoma facilitou bastante as pesquisas e incluiu a identificação de 289 ortólogos de *Drosophila* em genes de doenças humanas. No banco de dados do FlyBase estão disponíveis mais de 800 trabalhos que descrevem a relação de doenças humanas específicas com genes da *D. melanogaster*, indicando também a conservação de várias vias metabólicas e de sinalização neste e possivelmente em outros insetos (ORIEL; LASKO, 2018; PALANKER MUSSELMAN et al., 2011).

Assim como a *D. melanogaster*, muitos insetos são aplicados em estudos de sequenciamento e de clonagem permitindo um genoma totalmente

sequenciado facilitando o estudo genético. Nesses últimos anos, ocorreram avanços significativos na aplicação de insetos modelo, como o *Bombyx mori*, o *Tribolium castaneum*, o *Aedes aegypti* e o *Anopheles stephensi*. Tais estudos permitem a aplicação de mutantes destes organismos para análise de função do gene in vivo, além da identificação dos principais reguladores envolvidos como na síndrome metabólica para perspectiva em humanos (FRASER, 2012; PALANKER MUSSELMAN et al., 2011).

Em estudos do metabolismo lipídico, o inseto *Rhodnius prolixus*, é bastante representativo, pois a maior parte das informações acerca do metabolismo energético em insetos foi descoberta através do estudo deste modelo, além de ser um importante alvo de importância médica por ser um inseto hematófago, principal vetor da Doença de Chagas (LENT & WYGODZYNSK, 1979). Esse inseto foi um dos primeiros modelos utilizados para estudo do metabolismo em artrópodes, e se destaca como um importante modelo utilizado na elucidação do transporte lipídico através da lipoproteína Lipoforina (GRILLO; MAJEROWICZ; Ñ, 2007; GRILLO; PONTES; GONDIM, 2003). O *R. prolixus* teve seu genoma sequenciado (MESQUITA et al., 2015), o que tem permitido o estudo dos mecanismos adaptativos do inseto e novos alvos para controle biológico.

O inseto *T. castaneum* representa um modelo com padrão de evolução bastante resistente, ou seja, menos derivado e por isso mais conservado, o que sugere um modelo representativo no conteúdo e função dos genes, tomando destaque para estudo de desenvolvimento generalizado de insetos e permitindo maior semelhança com o *Homo sapiens* (RICHARDS et al., 2008). Além disso, análises de interação gene-alimento, como observado em trabalho apresentado por Grunwald e colaboradores (2013), foi observado o efeito de fatores dietéticos a partir da expressão de genes homólogos envolvidos na resistência ao estresse e responsáveis pelos efeitos sobre a longevidade, como os genes Nrf-2, Jnk-1 e Foxo-1.

O *T. castaneum*, conhecido como besouro vermelho da farinha, é descrito como o segundo melhor inseto estudado após *D. melanogaster* (BENTON; PAVLOPOULOS, 2014). Esse inseto tem surgido como modelo promissor em estudos de biologia molecular especialmente na aplicação de técnicas com o RNAi para identificar genes funcionalmente relevantes. Somado a isso, ele

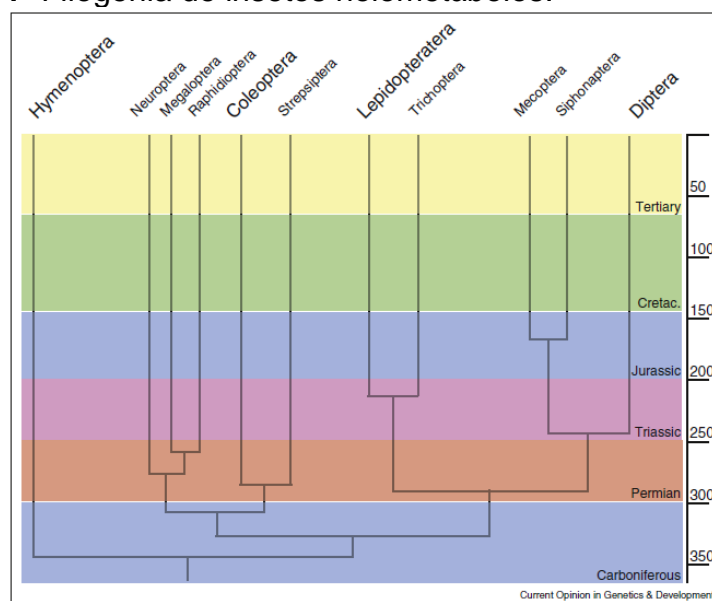
apresenta a facilidade de manipulação genética por ter seu genoma elucidado o que o torna ainda mais preciso para o estudo de diferentes pontos do metabolismo (FRASER, 2012). Assim, as investigações sobre a bioquímica dos insetos podem não só indicar caminhos para o controle de doenças e pragas agrícolas, mas também podem ajudar a entender um pouco mais sobre as doenças humanas.

2.2 O modelo: *Tribolium castaneum*

Conhecido como besouro vermelho da farinha ou besouro castanho, o inseto *T. castaneum* é uma das mais importantes pragas secundárias de produtos agrícolas armazenados, incluindo grãos ou outros alimentos secos armazenados. É um representante da ordem Coleoptera: Tenebrionidae, conhecida como a ordem dos besouros, a qual é bastante representativa com aproximadamente 40% das espécies de insetos conhecidas e 25% de todos os animais conhecidos. Além disso, essa ordem coleoptera se apresenta como um grupo externo (de acordo com filogenia de holometábolos na

Figura 1) para Lepidoptera e Diptera, que são de outra variedade de insetos estudados, sendo este clado constituído pela ordem coleoptera, fortemente representado pelo *T. castaneum* de acordo como o que é descrito em literatura (RYLEE et al., 2018; SCHMIDT-OTT; LYNCH, 2016).

Figura 1- Filogenia de insetos holometábolos.



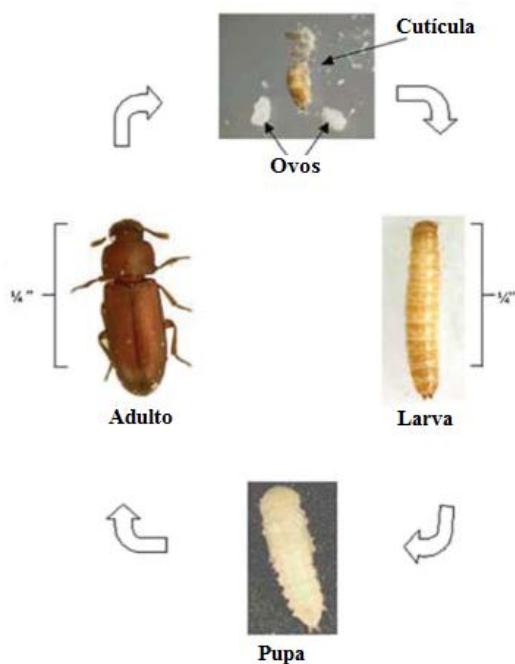
Fonte: SCHMIDT-OTT; LYNCH, 2016.

O *T. castaneum* é um inseto de distribuição ampla com origem indo-australiana, encontrado em áreas temperadas, mas com capacidade de sobreviver no inverno em locais protegidos (BALDWIN; FASULO, 2003). Sua evolução bem sucedida permitiu desenvolver um órgão semelhante ao rim em humanos, que corresponde aos túbulos de malpighi altamente evoluído, formando um arranjo conhecido como sistema criptonefridial (mantem a osmorregulação) para sobreviver em ambientes extremamente secos, além de adquirir resistência à todas as classes de inseticidas usados contra ele. Sua estrutura física apresenta elytra que é uma cobertura nas asas as quais coordenam precisamente o vôo, e também com o auxílio de asas dobráveis, proporcionando proteção (RICHARDS et al., 2008).

Esse besouro é muito pequeno, e de acordo com Baldwin e Fasulo (2003), pode medir cerca de 1/8 de polegada de comprimento, podendo viver por mais de três anos. Suas características físicas são: cor marrom-avermelhada, com antenas em três segmentos, uma cabeça visível sem bico e tórax com lados ligeiramente curvos. Existe um problema pela sua grande semelhança com o *Tribolium confusum*, porém suas diferenças já são bem descritas.

O *T. castaneum* torna mais viável os estudos genéticos pelo seu rápido ciclo de vida, facilidade de cultura, alta fecundidade e facilidade para cruzamentos genéticos. O ciclo de vida (**Figura 2**) tem duração entre 30 a 40 dias, com os mais altos índices de crescimento populacional registrados para produtos armazenados. Cada fêmea pode colocar de 150 a 600 ovos, a 25°C e 32°C, respectivamente, com uma média de 6 ovos por dia por 2 meses (EMBRAPA, 2006). A metamorfose completa desse inseto é descrita na **Tabela 1**.

Figura 2- Ciclo de vida do *Tribolium castaneum*



Fonte: BALDWIN; FASULO, 2003.

Tabela 1- Descrição sobre as fases de desenvolvimento durante o ciclo do *T. castaneum* sob condições ótimas (30-35°C e 80% de umidade relativa).

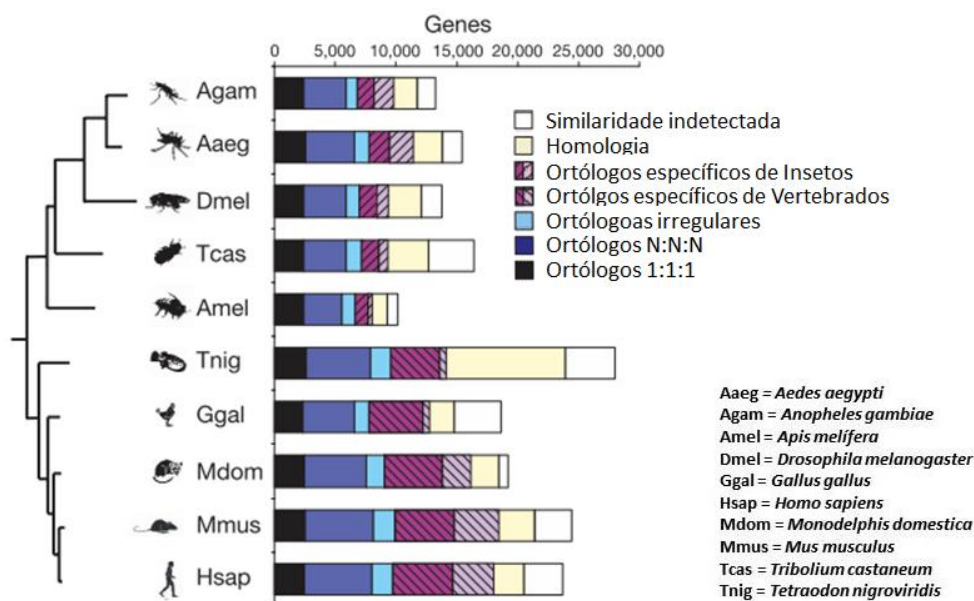
<i>Fase de desenvolvimento</i>	<i>Aspecto</i>	<i>Forma</i>	<i>Tempo no ciclo</i>
Ovo	Branco, microscópicos e muitas vezes unidos a pedaços de farinha	Oval 0,6 x 0,3 mm de comprimento	4 a 7 dias
Larva	Amarelo cremoso	Espessura fina de até 5mm com duas projeções pontiagudas escuras no último segmento do corpo	2 a 3 semanas
Pupa	Claros, brancos a amarelados	Parecem estar com crostas e pode ser sexada	5 a 8 dias

Fonte: BALDWIN; FASULO, 2003.

A partir de análise de conteúdo gênico em comparação entre insetos e vertebrados, observou-se que o genoma do *T. castaneum* apresentou sequências com intensa relação de homologia com outras espécies, incluindo humanos. Foi destacado mais de 47% dos genes de *Tribolium* (7.579) com relações ortogênicas rastreáveis entre insetos e vertebrados, sendo 15% (2.403) ortólogos universais de cópia única presente em todos os vertebrados, e apenas 9% (1.462 genes) que representam ortólogos específicos do inseto, e.

Figura 3A partir destes dados publicados por Richards et al. (2008) evidenciou-se o compartilhamento de 126 grupos de genes ortólogos entre o inseto *T. castaneum* e humanos. Essa importante homologia também foi fundamentada pelo estudo filogenético apresentado na **Figura 3**, em que a evolução do *T. castaneum* exibiu um ramo mais curto em comparação com a *D. melanogaster* e *Anopheles gambiae*, indicando uma evolução moderada dessa espécie. Isso implica num conjunto de diferentes genes ancestrais, os quais podem fornecer *insights* sobre a biologia desses insetos e a função de seus ortólogos de vertebrados.

Figura 3- Análise de genes ortólogos de um conjunto consensual de 16.404 genes de espécies de insetos (*Drosophila melanogaster*, *A. gambiae*, *Aedes aegypti*, *T. castaneum*, *A. mellifera*) e vertebrados (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Monodelphis domestica*, *Gallus gallus*, *Tetraodon nigroviridis*). Análise filogenética por máxima verossimilhança com o alinhamento múltiplo concatenado de 1.150 ortólogos de cópia única universal presentes em todos os organismos estudados.



Fonte: adaptado de RICHARDS et al., 2008.

Com os avanços das descobertas genéticas e necessidade de modelos mais simples que facilitem cada vez mais os estudos e os tornem mais rápidos, podemos dizer que o *T. castaneum* hoje representa um inseto indiscutivelmente promissor como escolha depois da *D. melanogaster*. Muitos estudos recentes abordam o uso desse modelo em pesquisas de genômica funcional, bem aplicado em técnicas de RNAi, além de modulação genética por edição do genoma mediada por CRISPR / Cas9, técnicas de transposição e identificação de transgênicos por marcadores fluorescentes (SCHMIDT-OTT; LYNCH, 2016).

A partir dessa ênfase dada ao *T. castaneum*, podemos sugerir a sua aplicação em estudos voltados para o metabolismo de lipídeos. Isso porque os insetos podem ser vantajosos para o avanço da nossa compreensão a respeito dessa via metabólica, especialmente em estudos de biologia molecular que permitem investigar reguladores do metabolismo lipídico (ARRESE; SOULAGES, 2010).

2.3 Metabolismo de lipídeos em insetos:

2.3.1 Digestão, absorção e transporte

Os lipídeos desempenham uma variedade de funções essenciais seja em insetos ou em qualquer outro organismo vivo. Dentre elas, os lipídeos podem constituir membranas celulares, ser precursoras de hormônios e vitaminas, formar importante reserva energética, e nos insetos, é essencial em determinados momentos como voo e ovogênese (CARVALHO et al., 2012). Além de ser a principal fonte metabólica em períodos de não alimentação (ARRESE; SOULAGES, 2010), como ocorre em insetos holometábolos (metamorfose completa) na fase de inanição (PATEL et al., 2005). No entanto, os processos de digestão, absorção, transporte, armazenamento e mobilização de lipídeos em insetos, são alvo de estudos ainda em constante construção (ALVES-BEZERRA; GONDIM, 2012; ARRESE; SOULAGES, 2010; DIOP; BIRSE; BODMER, 2017; HEIER; KÜHNLEIN, 2018; MAJEROWICZ et al., 2016).

Apesar da variedade alimentar dos insetos, considerando os diferentes habitats onde eles são capazes de viver, o processo de digestão dos lipídeos

ocorre pela hidrólise dos lipídeos complexos como triacilgliceróis (TAG), fosfolipídeos (FL) e ésteres de colesterol (CE). E assim como nos mamíferos, o TAG representa o principal componente lipídico da dieta, e principal forma de armazenamento dos ácidos graxos (TURUNEN; CRAILSHEIM, 1996).

As enzimas lipases responsáveis pela digestão de TAG são produzidas no intestino médio, e neste ocorre o processo absorptivo dos produtos dessa digestão (ARRESE et al., 2001; CANAVOSO; FREDE; RUBIOLO, 2004; CANAVOSO; WELLS, 2000; TURUNEN; CRAILSHEIM, 1996; GRILLO; MAJEROWICZ; GONDIM, 2007; GRILLO; PONTES; GONDIM, 2003). Nos insetos, as TAG-lipases são reconhecidas em alguns hematófagos como o *R. prolixus* (GRILLO; PONTES; GONDIM, 2003), *Panstrongylus megistus* (CANAVOSO; FREDE; RUBIOLO, 2004) e *A. aegypti* (GEERINC; FREYOGEL, 1975), em Lepidoptera como *Manduca sexta* (ARRESE; WELLS, 1994) e *B. mori* (PONNUVEL et al., 2003), e no besouro *Rhynchophorus palmarum* (SANTANA; BARBOSA; DINIZ, 2017) e *Callosobruchus maculatus* (SILVA et al., 2017).

Esse processo de digestão de TAG pode ocorrer de duas maneiras, variando em algumas espécies e sendo independente dos alimentos captados pelos organismos. Com isso, a hidrólise pode liberar: (i) ácidos graxos livres (AGL) e glicerol (TSUCHIDA; WELLS, 1988); (ii) monoacilglicerol (MAG) e AGL (HOFFMAN; DOWNER, 1979a).

Supõe-se que em geral ocorra a hidrólise formando MAG e AGL. Porém em insetos hematófagos (GONDIM et al., 2018) e *M. sexta* (TSUCHIDA; WELLS, 1988), há registros de hidrólise completa em AGL e glicerol antes mesmo da incorporação pelas células do intestino médio (CANAVOSO et al., 2001; CANAVOSO; FREDE; RUBIOLO, 2004).

Nessas condições, os ácidos graxos produzidos pela hidrólise desses lipídeos complexos da dieta são incorporados aos enterócitos através de uma proteína transportadora de ácidos graxos (FATP, *fatty acid transport protein*) que facilita o transporte pela membrana. Essa proteína foi identificada pelo aumento da sua expressão gênica horas após a alimentação, como visto no intestino de fêmeas de *A. aegypti* (SANDERS et al., 2003). Atualmente já se identifica a FATP com atividade intrínseca, de uma acil-CoA sintetase de cadeia longa

(FATP/ACSVL, *very long-chain acyl CoA synthetase*), ativando através da adição de uma molécula de coenzima A e com isso direcionado aos destinos metabólicos da célula (GREVENGOED; KLETT; COLEMAN, 2014).

Nas células intestinais, as moléculas de acil-CoA de cadeia longa (LCFA – *Long-Chain Fatty Acids*) são reincorporados em lipídeos complexos intestinais pela via do MAG com acilação do 2-MAG (ARRESE; ROJAS-RIVAS; WELLS, 1996; HOFFMAN; DOWNER, 1979b) ou pela via do ácido fosfatídico a partir da acilação do glicerol-3-fosfato catalisada pela glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT) (ALVES-BEZERRA; GONDIM, 2012; CANAVOSO; FREDE; RUBIOLO, 2004). Assim, nas células intestinais, o DAG formado é rapidamente convertido em TAG, sendo utilizado como reserva dos ácidos graxos absorvidos e em seguida exportado para a hemolinfa (via circulatória no invertebrados) através do empacotamento por partículas lipoproteicas e transportadas para tecidos periféricos para fim de suprimento energético (CANAVOSO et al., 2001).

Entende-se que esse processo de digestão e absorção nos insetos é bastante semelhante aos vertebrados, porém mais simples e com uma importante diferença no sistema de transporte lipídico, em que nos insetos é executado por uma lipoproteína chamada lipoforina (Lp) (Chino, Downer *et al.*, 1981; Chino e Takahashi, 1985; Soulages e Wells, 1994b; Palm, Sampaio *et al.*, 2012). Esta é a principal lipoproteína circulante na hemolinfa realizando o transporte predominantemente de DAG, e que tem a vantagem de ter um sistema que permite sua reutilização, de uma maneira diferente da que ocorre nos vertebrados que é por um processo mediado por endocitose inviabilizando sua reutilização (ATELLA, G.C.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, 2012; CANAVOSO et al., 2001).

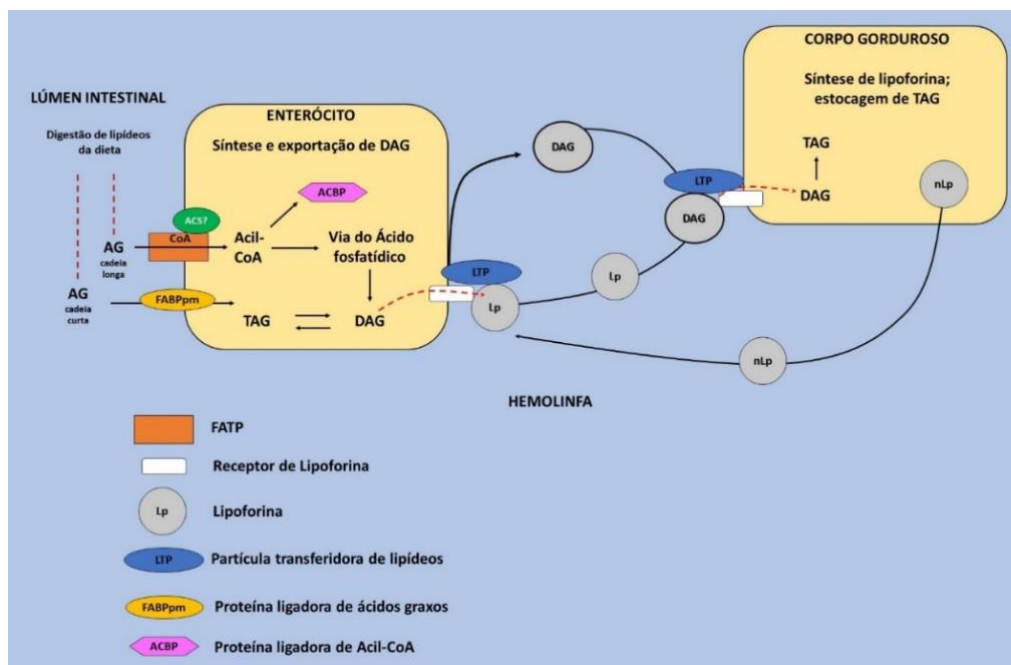
A Lp também atua no transporte de uma variedade de compostos lipídicos, como fosfolipídeos, colesterol e hidrocarbonetos, direcionando esses compostos para determinados tecidos envolvidos na síntese, absorção, armazenamento e utilização de lipídios. As classes lipídicas carregadas pela Lp vão variar de acordo com o estado fisiológico e entre as espécies de insetos. A variação em que ocorre esse transporte pode classificar a Lp de acordo com a sua densidade, como, LDLp (lipoforina de baixa densidade), HDLp (lipoforina de alta densidade) e VHDLp (lipoforina de densidade muito alta). Além disso, a Lp

desempenha uma ação aceptora e doadora entre os tecidos por reconhecimento através das apolipoproteínas (ApoLp) que a compõem em sua estrutura, e que podem ser: ApoLp-I e II, e a ApoLp-III, encontrada em condições específicas em adultos de algumas espécies (CANAVOSO et al., 2001).

O mecanismo para transferência lipídica através da Lp depende tanto de um estado energético que necessite desta transferência de um tecido para outro, quanto da presença de um receptor de lipoproteína (LpR), como comprovado em mosquito *A. aegypti* (SEO et al., 2003), e também observado em *R. prolixus* (ENTRINGER et al., 2013; GRILLO; PONTES; GONDIM, 2003). Nesse último caso, foi verificado que o transporte lipídico pela Lp é regulado pela intensidade da absorção dos lipídeos através da célula do intestino médio, e por consequência regula o fluxo de lipídeos na hemolinfa, ou seja, a dieta também exerce importante influência no controle do metabolismo lipídico por interferir diretamente na regulação da interação da Lp com o intestino.

Contudo, ainda é descrito outra lipoproteína hemolinfática só que dessa vez atuando no controle dessa transferência de lipídeos, que é a chamada partícula transferidora de lipídeo (LTP), pela qual é inviabilizada a internalização da Lp, ou seja, ela atua como facilitador do reabastecimento e reutilização da Lp. Apesar de não se conhecer exatamente como ocorre a ação da LTP, estudos relatam a sua importância no processo de transferência de DAG do intestino médio para Lp, como foi avaliado em *M. sexta* com DAG marcado (CANAVOSO et al., 2001). Para melhor compreensão, um resumo ilustrativo é mostrado na **Figura 4** indicando um modelo de absorção de ácidos graxos, síntese de DAG e exportação pela Lp.

Figura 4- Esquema do processo de digestão, absorção, síntese de DAG e exportação para lipoforina. AG = Ácidos Graxos; ACS = Acil-CoA sintetase; DAG = Diacilglicerol; TAG = Triacilglicerol; FATP = Proteína transportadora de ácidos graxos; Lp = Lipoforina; nLp = Lipoforina nascente; LTP = Partícula transferidora de lipídeos.



Fonte: FREIRE, 2018.

O fluxo de lipídeos da dieta que segue para a hemolinfa deve exercer uma taxa constante, visto que a concentração de TAG armazenada nos enterócitos serve de manutenção para constante formação de DAG e sua exportação para hemolinfa evitando assim o seu acúmulo que pode ser tóxico em altas concentrações além de assegurar também a absorção máxima de ácidos graxos a partir do lúmen do intestino (CANAVOSO; WELLS, 2000). No meio intracelular, o controle dos ácidos graxos é gerenciado por proteínas ligadoras de lipídeos as quais já foram identificadas em várias espécies, todavia seu mecanismo de direcionamento para determinadas vias metabólicas continua desconhecido (CANAVOSO et al., 2001; ESTEVES; EHRLICH, 2006; NEESS et al., 2015).

2.3.2 Estocagem e mobilização de ácidos graxos no corpo gorduroso

Nos insetos, a maior parte dos lipídeos da dieta são transferidos e armazenados no corpo gorduroso (CG), onde também é realizado o processo de síntese *de novo* a partir de precursores glicídicos fazendo com que seja o principal sítio de estocagem de TAG e de glicogênio, compondo um papel

essencial no armazenamento e utilização de energia (M.TH. BEENAKKERS; VAN DER HORST; VAN MARREWIJK, 1985; STEELE, 1982). No entanto, além do CG, os ovários também são descritos com capacidade de fazer síntese *de novo*, porém neste tecido não foi identificada capacidade tão maior quanto no CG (LORENZ; ANAND, 2004).

O corpo gorduroso também tem um importante papel na síntese de grande parte das proteínas da hemolinfa, como a Lp, vitelogeninas (aminoácidos utilizados na morfogênese) e metabólitos circulantes para a maturação de óvulos (ARRESE; SOULAGES, 2010; LORENZ; ANAND, 2004). Por tais razões, é considerado o principal órgão de controle metabólico nos insetos, porque coordena componentes específicos de diversas vias, exercendo função análoga ao tecido adiposo e fígado dos vertebrados (M.TH. BEENAKKERS; VAN DER HORST; VAN MARREWIJK, 1985).

Existe um mecanismo rígido de controle do metabolismo no CG para coordenar de forma precisa todas as demandas do inseto, e quando se trata da estocagem dos lipídeos, deve ser considerado as diferenças nos estilos de vida dos insetos, como nos insetos hematófagos e em insetos generalistas com comportamento oportunista de alimentação, na qual pode variar os nutrientes e intervalos de alimentação (GONDIM et al., 2018; LORENZ; ANAND, 2004). Todavia, os insetos em geral precisam gastar energia constantemente, o que faz necessário acumular reservas em períodos de abundância de alimentos (ARRESE; SOULAGES, 2010).

O principal conteúdo estocado no CG é lipídico, compondo 50% ou mais do seu peso corporal seco (M.TH. BEENAKKERS; VAN DER HORST; VAN MARREWIJK, 1985). Durante a lipogênese nos insetos, o DAG é o precursor direto para formação de TAG. A formação do DAG, descrita anteriormente (secção 2.3.1) nos enterócitos, acontece a partir da via do ácido fosfatídico ou via do monoacilglicerol, além da degradação dos fosfolipídios e hidrólise do triglicerídeo pelas lipases (ARRESE; SOULAGES, 2010). Então a formação do TAG surge da esterificação do DAG catalisado pela diacilglicerol aciltransferase (DGAT) em uma reação que utiliza acil-CoA graxo (ATHENSTAEDT; DAUM, 2006)

O processo de síntese de ácidos graxos já foi visualizado no CG de alguns insetos, como nas mariposas, *M. sexta* e *B. mori*, onde há incorporação de acetato e metabolização em TAG (ARRESE et al., 2001). Esse processo é importante para insetos que acumulam grandes reservas lipídicas em seu corpo gorduroso, mas se alimentam de dietas ricas em carboidratos e com baixo teor lipídico, assim como investigado no *Gryllos bimaculatus*, onde a síntese de lipídeos a partir de acetato é mediada pela atividade da enzima ácido graxo sintase (LORENZ; ANAND, 2004).

A síntese *de novo* nos insetos, ocorre pela ação consecutiva de duas enzimas: (i) acetil-CoA carboxilase (ACC), que catalisa a síntese de malonil-CoA a partir de acetil-CoA, detectada no corpo gorduroso da mosca *Glossina morsitans* (Goldring e Read, 1994); (ii) e a ácido graxo sintase, uma enzima complexa, que utiliza malonil-CoA para sequencialmente adicionar unidades de dois carbonos a um iniciador de acetil-CoA para produzir o ácido graxo (ALABASTER et al., 2011).

A distribuição e disposição em que esse tecido se encontra ao longo do ciclo de vida dos insetos, permite facilitar o acesso à hemolinfa e contribuir para a adaptação energética em condições fisiológicas extremas como acontece no momento do voo, que exige maior consumo, e no processo de ovogênese em que as reservas são necessárias para suportar o desenvolvimento do embrião (ARRESE; SOULAGES, 2010). A remodelação do corpo gorduroso foi analisada como um processo essencial para adaptação fisiológica e energética especialmente visualizado no estado inicial da metamorfose (ZHENG; YANG; XI, 2016).

De acordo com Zheng, et.al (2016), o processo de alteração morfológica do corpo gorduroso acontece durante a metamorfose entre larva e adulto, quando na fase de larva logo antes da pupação, as células de gordura são consumidas ou destruídas em grande quantidade perdendo sua forma poligonal. E após a formação da pupa, estas células são regeneradas tornando-se esféricas, ou seja, uma parte da reserva na larva é mobilizada no momento da formação da pupa, e em seguida é recuperada. Durante esta fase, as células são desassociadas e redistribuídas, mantidas como reserva energética até os 3

primeiros dias da fase adulta quando então o inseto passa a ingerir o alimento e novas células adiposas são regeneradas. Então pode-se dizer que as células de gordura inicialmente estocadas no final da fase de larva serviu como importante estocagem nutricional para formação do adulto e manutenção dos primeiros dias até o início do seu hábito alimentar.

Observando esse processo de mobilização em *D. melanogaster*, receptores do fator de crescimento estimularam a remodelação prematura do corpo gorduroso por sinalização do hormônio ecdisona (20- hidroxecdisona, 20E) o qual induziu a dissociação de células adiposas e formação da pupa (BOND; HOSHIZAKI; GIBBS, 2010; NELLIOT; BOND; HOSHIZAKI, 2006).

A gotícula lipídica nos insetos, correspondem aos adipócitos nos mamíferos, formando as células do corpo gorduroso e que podem ser marcadas pelo corante lipídico neutro vermelho do nilo ou BODIPY em diversas análises (LIU; HUANG, 2013). A estrutura das gotículas lipídicas consiste em um núcleo de lipídios neutros cercados por uma camada mono-fosfolipídica que é revestida por uma variedade de proteínas associadas (ZHENG; YANG; XI, 2016). Servem como depósitos de energia flexíveis sob demanda para manter a homeostase da energia durante os estágios de desenvolvimento, sem alimentação ou no estresse metabólico (HEIER; KÜHNLEIN, 2018).

Estudos sugerem processos regulatórios importantes no corpo gorduroso, especialmente na larva, mediado por componentes hormonais que regulam o metabolismo de TAG nesse tecido. Entre eles estão o peptídeo semelhante à insulina (ILP), o hormônio adipocinético (AKH), o hormônio juvenil (JH) e a sinalização por ecdisona (20HE). O JH e 20HE regulam a muda, a metamorfose e a reprodução em insetos (GONDIM et al., 2018; HEIER; KÜHNLEIN, 2018). Já o AKH é considerado semelhante ao glucagon em mamíferos, regulando o metabolismo energético nos insetos (ARRESE; SOULAGES, 2010; LIU; HUANG, 2013; LORENZ; ANAND, 2004).

A regulação do metabolismo de carboidratos e lipídeos em mamíferos é exercido em parte pela insulina, produzida pelas células- β do pâncreas (SALTIEL; KAHN, 2001). Já em insetos, como não há pâncreas, existem as células de corpora cardíaca localizadas na glândula larval, que podem secretar

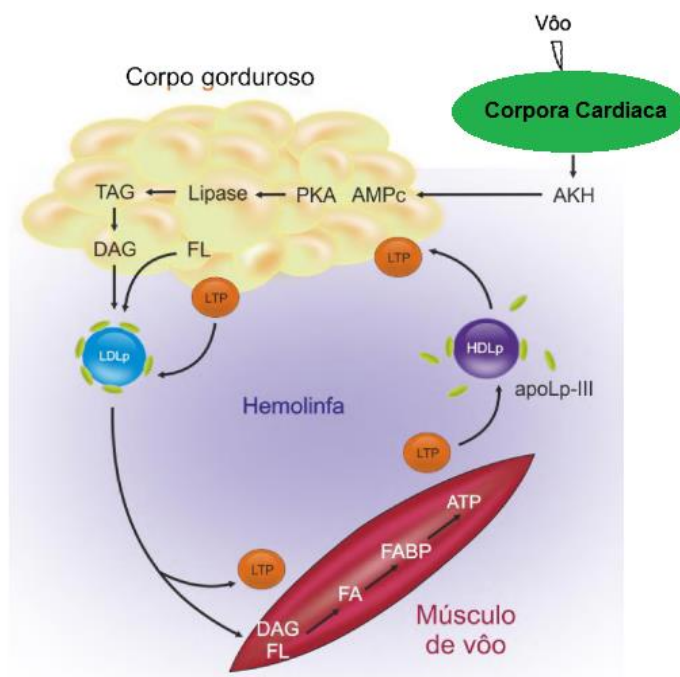
AKH, semelhante ao glucagon (LIU; HUANG, 2013). Esse hormônio tem como alvo principal o corpo gorduroso, pois entre suas ações, está a regulação do metabolismo energético através da mobilização de carboidratos e lipídios durante a atividade locomotora, a inanição e a reprodução (ARRESE; SOULAGES, 2010).

Na etapa de mobilização, existe uma importante ação da triacilglicerol lipase (TAG-Lipase) descrita inicialmente por ARRESE e WELLS (1994) em *M. sexta* e avaliado como análogo à lipase hormônio sensível (HSL) do tecido adiposo de vertebrados. A TAG-lipase é a principal lipase caracterizada em insetos e um sistema lipolítico alternativo em *Drosophila* (HEIER; KÜHNLEIN, 2018). A TAG lipase é uma enzima fosforilável que tem sua ação estimulada pelo hormônio adipocinético (AKH), secretados pela corpora cardiaca das células neurosecretoras na hemolinfa no momento de exigência energética resultando na liberação de DAG pelo corpo gorduroso (ARRESE et al., 2001; ARRESE; WELLS, 1994; LU et al., 2019). Alguns dados mostram a regulação de AKH como hormônio responsável por regular os níveis de trealose e DAG na hemolinfa, e em alguns insetos também estimula a síntese de prolina (ARRESE; SOULAGES, 2010; LU et al., 2019). Em estudo feito com *Gryllus bimaculatus*, conhecido como grilo africano, foram realizadas injeções de AKH que levou à diminuição da capacidade de síntese lipídica do ovário e conseqüente diminuição das reservas de energia do corpo gorduroso, indicando que AKH controla os mecanismos de formação e mobilização dessas reservas (AHN et al., 2015). Esse mesmo efeito foi identificado pelo knockdown do gene do receptor AKH que causou aumento do conteúdo de TAG no corpo gorduroso e no músculo de *R. prolixus* (ALVES-BEZERRA et al., 2016).

O AKH exerce seus efeitos na mobilização lipídica via transdução de sinal, e se inicia pela necessidade de alta demanda energética, como por exemplo, o vôo dos insetos, a qual induz sua secreção na hemolinfa. No CG, o AKH induz a ativação de via adenilato ciclase, que pode mediar o influxo de Ca^{2+} por IP3 (Trifosfato de inositol) e aumento da concentração de [AMPC] (adenosina monofosfato cíclico) estimulando a PKA (proteína cinase A) a qual ativa a enzima TAG-lipase por fosforilação (**Figura 5**) (ARRESE; SOULAGES, 2010;

AUERSWALD; SIEGERT; GÄDE, 2005; CANAVOSO et al., 2001; LU et al., 2019; PATEL et al., 2005).

Figura 5 – Modelo de mobilização de lipídeos por hormônio adipocinético (AKH) e transporte para músculo de voo. AKH: hormônio adipocinético; AMPc: AMP cíclico; PKA: proteína cinase dependente de AMPc; TG: triacilglicerol; DG: diacilglicerol; FL: fosfolipídeos; LTP: partícula transferidora de lipídeos; LDLp: lipoforina de baixa densidade; FA: ácido graxo; FABP: proteína ligadora de ácidos graxos; HDLp: lipoforina de alta densidade; apoLp-III: apolipoproteína III.



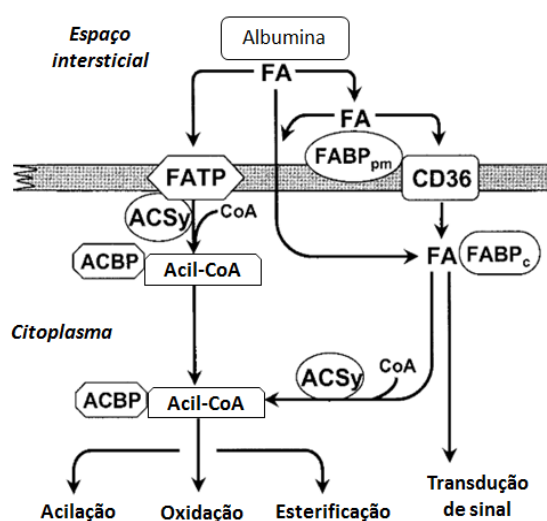
Fonte: ATELLA, G.C.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, 2012.

No momento em que há lipólise no CG, o DAG é transferido inicialmente para uma HDLp preexistente na hemolinfa por ação da LTP para transporte em direção aos tecidos de utilização como músculo de voo. À medida que o DAG é adicionado ao HDLp, a partícula aumenta de diâmetro e incorpora ApoLp-III à sua superfície configurando a transformação para uma LDLp, com massa 2x maior que HDLp. Esse LDLp transporta DAG até a matriz extracelular e às membranas basais dos músculos em repouso e de vôo, onde uma lipase do músculo hidrolisa DAG em AGL e glicerol e assim é absorvido pelo músculo. Com isso, o LDLp perde o seu abastecimento de DAG e a apoLp-III que havia sido incorporada, retornando a sua estrutura de HDLp (**Figura 5**) (CANAVOSO et al., 2001; VAN DER HORST; RODENBURG, 2010).

2.4 Transporte intracelular de lipídeos

Visualizando os lipídeos no meio intracelular, observamos que nos vertebrados, os ácidos graxos de cadeia longa presente no plasma estão normalmente ligados a albumina e assim são direcionados as células de utilização como as do músculo, e incorporados em meio intracelular por difusão passiva e/ou mediado por transportadores como proteínas ligadoras de ácido graxo associadas à membrana (FABP_{pm}) ou proteínas transportadoras de ácidos graxos/acil-CoA sintetase (FATP/ACSVL) e translocase de ácidos graxos de membrana plasmática (CD36). Em meio citosólico, os AGs de cadeia longa estão ligados à proteínas ligadoras de ácido graxo (FABP) que possivelmente direcionam para a sua ativação pela ACS e assim ser conduzido para os diferentes processos metabólicos mostrados na **Figura 6**, em especial para a β oxidação, ou para estocagem na forma de TAG, ou ainda convertidos em fosfolipídios de membrana (AZZAZY; PELSERS; CHRISTENSON, 2006; DOURLEN et al., 2015).

Figura 6- Esquema geral de captação e transporte intracelular de ácidos graxos de cadeia longa em vertebrados.



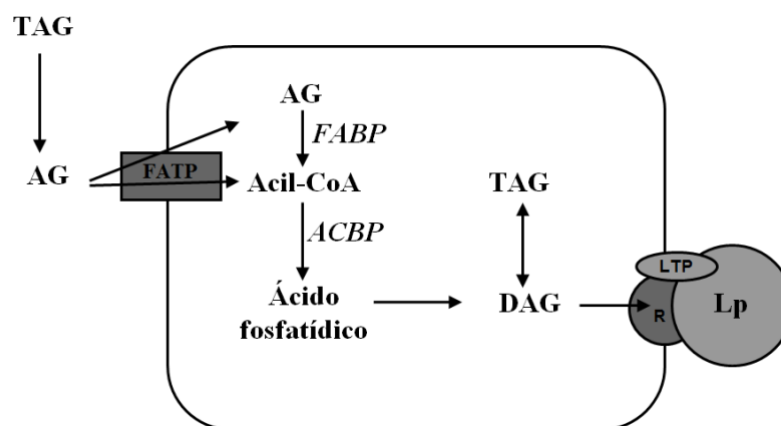
Fonte: Modificado de (AZZAZY; PELSERS; CHRISTENSON, 2006).

Nos insetos esse caminho acontece de maneira bem semelhante, os lipídeos absorvidos e presentes em meio intracelular seja por via exógena ou endógena (síntese *de novo*), serão ativados por adição de uma coenzima A, através de uma ACS (acil-CoA sintetase), formando acil-CoA graxo e assim direcionado para as diversas vias do metabolismo. Entretanto, assim como nos vertebrados, estes AG esterificados ou não precisam se associar às proteínas de ligação como a FABP e ACBP, para serem direcionados para reações metabólicas e impedir que estas moléculas hidrofóbicas permaneçam livres no citosol causando a desestabilização das membranas celulares (ESTEVEZ; EHRLICH, 2006; KNUDSEN et al., 2000; NEESS et al., 2015).

Essas proteínas ligadoras tem papel essencial na disponibilização dos lipídeos no meio intracelular em insetos, já que estes são a principal fonte energética nos importantes processos metabólicos. Entre elas, a ACBP se mostra mais significativa no controle metabólico por se ligar ao acil-coA graxo com afinidade e especificidade 4x maior que a ligação de FABP (ALVES-BEZERRA et al., 2010a) e estar envolvido em uma variedade maior de sinalização celular. As proteínas responsáveis pela captação, como a FATP, e transporte intracelular, como a ACBP, já foram identificadas em importantes modelos de insetos como *M. sexta*, *B. mori*, *D. melanogaster*, *Eilema japonica*, *R. prolixus* (ALVES-BEZERRA et al., 2010a; DOURLLEN et al., 2015; NIOT et al., 2009; QIAN et al., 2011; SMITH et al., 1992).

A necessidade de ligação da molécula de acil-CoA à ACBP dentro das células, foi evidenciada em estudos com *R. prolixus* onde observou-se que quanto maior a ingestão de dieta rica em lipídeos, maior a quantidade de acil-CoA ligado às ACBPs permitindo o acesso desses lipídeos as via metabólicas (ALVES-BEZERRA et al., 2010a). No entanto, alguns pontos deste transporte lipídico intracelular, mostrado na **Figura 7**, ainda não é bem compreendido, como o mecanismo de absorção de ácidos graxos na célula do intestino médio e o mecanismo de ação intracelular.

Figura 7 – Modelo para captação e transporte intracelular em insetos. O esquema enfatiza as possíveis etapas envolvidas na absorção de ácidos graxos (AG) no enterócito do intestino médio, a ação da proteína de transporte de ácidos graxos (FATP) e das proteínas de ligação intracelular, como a proteína de ligação a ácidos graxos (FABP) e a proteína ligadora de acil-coA (ACBP), além da síntese de diacilglicerol (DAG) e sua exportação da célula para a hemolinfa. TAG= triacilglicerol; Lp= lipoforina; R= receptor de lipoforina; LTP= partícula transferidora de lipídeos.



Fonte: Autora, 2020.

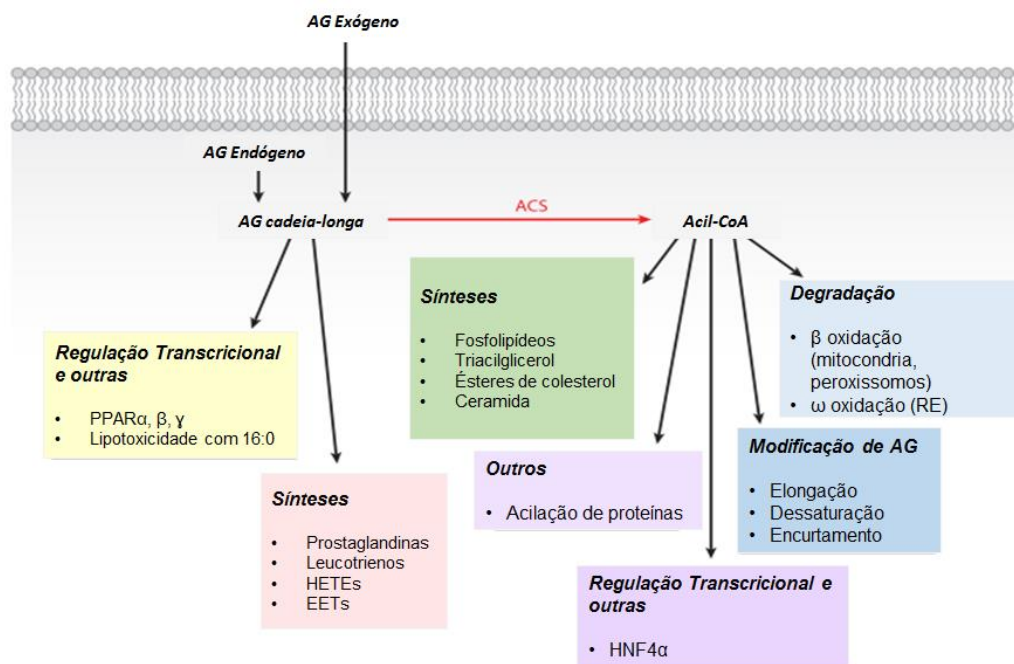
Uma questão importante que ainda não é bem conhecida, é como os lipídeos são conduzidos e liberados das proteínas ligadoras para as rotas energéticas. Nos insetos em geral, grande parte dos lipídeos são formados principalmente ou exclusivamente durante os estágios larvares ou no início da vida adulta, e a maioria é destinado para produção de ovos (ARRESE et al., 2001; LORENZ; ANAND, 2004). Com isso, procura-se entender como as células lipídicas respondem durante a necessidade de armazenamento / mobilização e sua regulação. Nos dados mostrados em *M. sexta* o momento em que o corpo gorduroso deixa de fazer a síntese e passa a mobilizar os lipídios, ocorre somente após a cessação da alimentação (ZIEGLER, 1991), diferente do que ocorre no *G. bimaculatus* que não tem um período de não alimentação (hibernação) e se alimentam em todos os estádios, e mesmo assim utiliza essa reserva no corpo gorduroso para o desenvolvimento dos ovócitos e provavelmente também outras fontes contribuem significativamente (LORENZ; ANAND, 2004). Na discussão apresentada por Grevengoed e colaboradores (2014), a capacidade ou direcionamento das acil-coAs para as via metabólicas

ocorre por partição, no qual vai variar pelo tipo de célula, localização intracelular dos transportadores e enzimas, estado celular energético e sinais hormonais.

2.4 O acil-CoA e seus efeitos no metabolismo de lipídeos

No metabolismo lipídico celular em geral, a esterificação dos ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) em acil CoA é bem compreendida como uma etapa obrigatória para sinalização e utilização, especialmente no controle energético onde esses ésteres de acil-CoA graxos de cadeia longa se apresentam como substrato e intermediário metabólico na biossíntese e no catabolismo de lipídios além de desempenhar papel importante na regulação do metabolismo de carboidratos, expressão gênica e transdução de sinal (FAERGEMAN; KNUDSEN, 1997). Porém, mesmo antes da ativação, os respectivos AGCL também podem agir em vias de sinalização, ativar fatores de transcrição e modular alostericamente reações enzimáticas (**Figura 8**). Os AG, em especial, os AGCL (12-20 carbonos) são ativados por reações de grande demanda energética, dividida em 2 etapas: (i) $\text{Ácido graxo} + \text{ATP} \rightarrow \text{acil -AMP} + \text{PPi}$; (ii) $\text{Acil -AMP} + \text{CoASH} \rightarrow \text{acil - CoA} + \text{AMP}$ (GREVENGOED; KLETT; COLEMAN, 2014).

Figura 8 – Efeito metabólico celular de ácidos graxos de cadeia longa e seu respectivo acil-coA.



Fonte: adaptado de GREVENGOED; KLETT; COLEMAN, 2014.

Além da ativação dos AG estar envolvido com a metabolização e sinalização celular, esse processo de tioesterificação a coenzima A, impede a sua saída da célula e facilita a movimentação de um ácido graxo em meio aquoso (GREVENGOED; KLETT; COLEMAN, 2014). No entanto por adquirir natureza anfipática, os acil-CoAs podem interferir na integridade da membrana quando em concentrações maiores, e agir como detergentes, formando associações micelares em solução aquosas (FAERGEMAN; KNUDSEN, 1997; GREVENGOED; KLETT; COLEMAN, 2014). Essa possibilidade faz com que a molécula de acil-CoA em concentrações críticas possa ser frequentemente denominada como causa potencial de lipotoxicidade, resultando em apoptose (LI; KLETT; COLEMAN, 2010).

No entanto, 60% das moléculas de ésteres de acil-CoA quando agregadas, se tornam sujeitas à hidrólise (JUGUELIN; BESSOULE; CASSAGNE, 1991). Mas como a perda constante por hidrólise também não é favorável à célula, a auto agregação de acil-CoAs e a sua exposição em concentrações críticas no citosol, é normalmente impedida por sua ligação à proteínas e membranas, fazendo com que a concentração de acil-CoAs livre

para auto-agregação seja muito baixa (GREVENGOED; KLETT; COLEMAN, 2014).

A concentração total de éster de acil-CoA em meio intracelular é descrito entre 5–160 $\mu\text{mol/L}$, variação grande que depende do tecido envolvido e do seu estado metabólico (FAERGEMAN; KNUDSEN, 1997; KNUDSEN et al., 2000; NEESS et al., 2015). Avaliando os principais acil-CoAs de cadeia longa, 18:1-CoA e 16:0-CoA, observou-se uma concentração micelar crítica de aproximadamente 32 μM e 42 μM , respectivamente (GREVENGOED; KLETT; COLEMAN, 2014). Ao ponto que NEESS et al. (2015) afirma que palmitoil-CoA (16:0-CoA), estearoil-CoA (18:0-CoA) e oleoil-CoA (18:1-CoA) foram determinados a 70, 12 e 33 μM , respectivamente (CONSTANTINIDES; STEIM, 1985, 1988), enquanto o ácido oleico atinge sua concentração micelar crítica antes, com 6 μM (DAVIS; RICHENS; O'SHEA, 2011). Contudo, podemos afirmar que a concentração de acil-CoAs de cadeia longa intracelular pode variar bastante, sendo que a concentração livre a qual está disponível para os destinos metabólicos e de regulação, não é definida.

Diante de experimentos *in vitro* foi possível concluir que no limite para manutenção da integridade celular, a concentração de acil-CoA livre intracelular estará na faixa de 0,1 a 200 nmol/L sob condições fisiológicas normais (KNUDSEN et al., 2000). No entanto, pode haver locais específicos em que a concentração de acil-CoA possa teoricamente ser muito mais alta (LI; KLETT; COLEMAN, 2010). Essa variação dos níveis de ésteres de acil-CoA ainda mudam significativamente em diferentes condições, como jejum, diabetes, ingestão de gordura/glicose e ingestão de fármacos, porém poucos estudos descrevem essa distribuição intracelular. É difícil hipotetizar o total de acil-CoA que é mantido em meio citosólico, esteja ligado a uma proteína ou não, mas acredita-se que até 78% do total de acil-CoA seja citosólico (KNUDSEN et al., 2000; RASMUSSEN et al., 1994).

Contudo, o principal fator determinante da concentração intracelular e do comprimento do acil-CoA serão as taxas de síntese e utilização, visto que a síntese será determinada pela ativação de ACSs e a utilização pela taxa de degradação via beta-oxidação, e também por incorporação de lipídios celulares,

hidrólise de acil-CoA e acilação de proteínas (GREVENGOED; KLETT; COLEMAN, 2014; KNUDSEN et al., 2000; NEESS et al., 2015).

Essas moléculas funcionam como importantes reguladores de uma ampla gama de funções celulares e não apenas como intermediários essenciais no metabolismo lipídico. A ampla função regulatória de acil-CoA já foi evidenciada a partir de estudos *in vivo* e *in vitro*. Dentre essas funções incluem a regulação de enzimas no metabolismo de carboidratos e lipídios, translocases, canais iônicos e bombas, proteínas quinases, fatores de transcrição nuclear, proteases e transporte de proteínas (FAERGEMAN; KNUDSEN, 1997; KNUDSEN et al., 2000; NEESS et al., 2015).

Grande parte da regulação do acil-CoA de cadeia longa no metabolismo energético, pode ocorrer em concentrações muito mais baixas que a necessária para agregação micelar, portanto, a variação de acil-CoA intracelular pode variar em ampla faixa sem que haja necessariamente a agregação, porém com efeitos significativos, já que a mínima variação já torna suficiente para alterar qualquer reação no metabolismo celular (NEESS et al., 2015).

Existe uma variedade de ações estabelecidas pela elevação dos níveis de acil-CoAs, especificamente os de cadeia longa (LC-CoA). No metabolismo de glicose, demonstram interagir com a sinalização de insulina, por modulação da atividade enzimática e regulação do fluxo de íons (ELLIS et al., 2000).

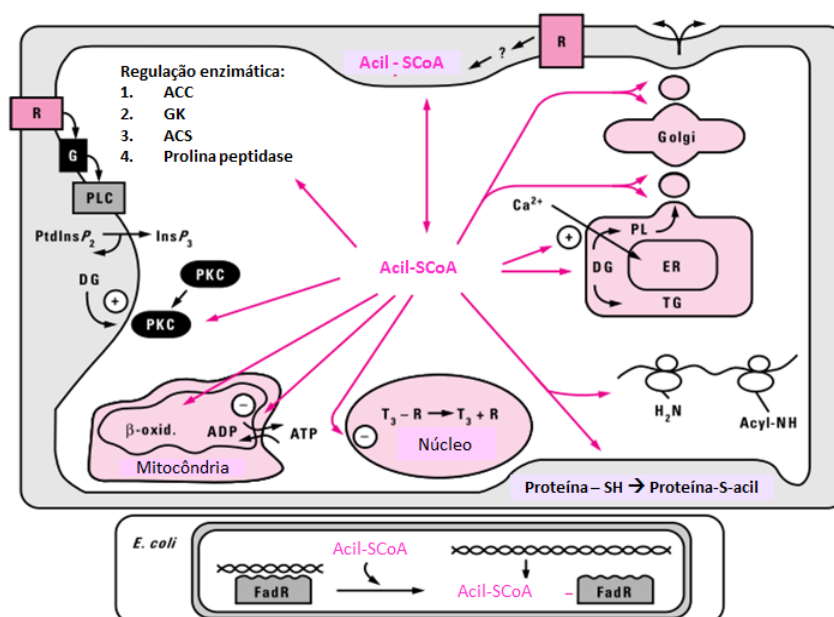
No metabolismo de lipídeos os acil-CoAs participam da regulação das vias biossintéticas lipídicas inibindo alostericamente a acetil-CoA carboxilase (ACC) (OGIWARA et al., 1978) a qual catalisa a etapa inicial e limitante da velocidade de biossíntese de ácidos graxos de cadeia longa, e mesmo na presença de citrato, um ativador do ACC, o acil-CoA impede a ligação. Porém essa ligação pode ser reversível com a adição de um complexo inibidor enzimático com receptor de acil-CoA de cadeia longa (NEESS et al., 2015).

Ainda no metabolismo lipídico, LC-CoA atuam na regulação de vias de degradação agindo diretamente na TAG-lipase do tecido adiposo, e na lipase sensível ao hormônio (HSL) do tecido adiposo e em ilhotas analisado em camundongos, porém, as análises são divergentes, pois LC-CoA deve inibir a

lipólise em adipócitos, mas estimular a lipólise nas ilhotas pancreáticas testado em camundongos normais e nulos-HSL (HU et al., 2005). Essa atividade lipásica gerada por LC-CoA nas ilhotas deve contribuir para estímulo de secreção de insulina enquanto o LC-CoA elevado nos adipócitos inibe a lipólise, assim como observado no músculo de ratos anteriormente (ELLIS et al., 2000). As ações opostas do LC-CoA diminuem a gordura circulante inibindo sua liberação dos adipócitos e promovendo o armazenamento de gordura via ação da insulina. Avaliando a presença da ACBP, verificou-se que o efeito estimulador na atividade da lipase das ilhotas foi bloqueado pela ACBP, provavelmente pela ligação e sequestro de LC-CoA, no entanto o efeito inibitório da LC-CoA na HSL dos adipócitos foi dependente da fosforilação e aumentada pela ACBP (HU et al., 2005).

Contudo sabe-se que há uma importante regulação, mas em muitos casos ainda não conclusivos, fazendo com que essa molécula seja direcionada para diversas regiões da célula. Na **Figura 9** temos uma visão geral das vias de regulação.

Figura 9- Ésteres de Acil-CoA de cadeia longa como regulador do metabolismo energético, canais iônicos, tráfico vesicular e fatores de transcrição. Legenda: ACC= acetil-CoA carboxilase; ACS= acil-CoA sintetase; acil-SCoA= éster de acil-CoA; β -oxid.= β -oxidação; DG= diacilglicerol; ER= retículo endoplasmático; G= G-proteína; GK= glucoquinase; PL= fosfolípido; PLC= fosfolipase C; R= receptor; T₃= tri-iodotironina; TG= triacilglicerol.



Fonte: Adaptado de FAERGEMAN; KNUDSEN, 1997.

A presença de LC-CoAs em meio intracelular é capaz de atuar de diversas maneiras modulando a atividade de numerosos enzimas envolvidas no metabolismo intermediário, canais iônicos, tráfico vesicular e fatores de transcrição (FAERGEMAN; KNUDSEN, 1997; GREVENGOED; KLETT; COLEMAN, 2014). Porém é importante observar que os efeitos regulatórios avaliados até aqui dependem das concentrações de acil-CoA livre no citoplasma. Mas a fim de observações fisiologicamente relevantes, observamos o controle dessa concentração através da ligação dessas moléculas à proteínas ligadoras, como a ACBP. Visto que essas moléculas funcionam como importantes reguladores de uma ampla gama de funções celulares e não apenas intermediários essenciais no metabolismo lipídico. A concentração total e a disponibilidade de ácidos graxos e ésteres de acil-CoAs de cadeia longa são cuidadosamente controlados mediante as necessidades celulares (HU et al., 2005).

2.5 Proteínas ligadoras de Acil-CoA (ACBP)

As importantes ações regulatórias das acil-CoAs implicam na necessidade de uma liberação finamente controlada na célula. Embora haja domínio de ligação para LC-CoA em várias proteínas intracelulares, como FABP e SCP2, apenas a ACBP é considerada a única com afinidade altamente específica e a principal ligadora de acil-CoA de cadeia longa (FAERGEMAN et al., 2007; KNUDSEN, 1990; NEESS et al., 2015).

A descoberta da ACBP foi elucidada no decorrer dos anos por pesquisas isoladas, sendo a sua primeira isoforma identificada a partir do tecido de fígado bovino (KNUDSEN et al., 2000). Porém, a sua descoberta foi iniciada antes disso, a partir de cinco grupos de estudos diferentes, caracterizando funções além da sua ligação ao acil-CoA, as quais foram:

1) inibidor da ligação ao diazepam, um peptídeo cerebral capaz de inibir a ligação do diazepam aos receptores benzodiazepínicos ($GABA_A$), de onde vem seu nome original, inibidor da ligação do diazepam (DBI, do inglês *diazepam binding inhibitor*) (GUIDOTTI et al., 1983);

2) polipeptídeo capaz de induzir a terminação da síntese de ácidos graxos por ligação ésteres de acil-CoA com alta afinidade (MOGENSEN et al., 1987)

3) peptídeo estimulador adrenal, aumentando o transporte de colesterol para células de Leydig na mitocôndria em bovino (YANAGIBASHI et al., 1988)

4) peptídeo intestinal inibidor da secreção de insulina induzida por glicose em porcos (CHEN et al., 1988)

5) peptídeo liberador de colecistocinina (CCK) no intestino (HERZIG et al., 1998)

A sua descoberta como uma possível molécula ligadora de ésteres de acil-CoA foi inicialmente como uma impureza em uma preparação de FABP (MOGENSEN et al., 1987). Em seguida vários estudos indicaram a presença de uma ACBP a qual contribui para o transporte e formação de *pool* de acil-CoA intracelular. (LEE et al., 2007)

Dentre as funções estabelecidas, descobriu-se que ela pode efetivamente impedir que o produto do éster acil-CoA de cadeia longa atue sobre o ACC e a adenina nucleotídeo translocase (ANT), enzima mitocondrial responsável pela reação de troca de ADP e ATP na membrana mitocondrial interna durante a síntese e liberação de ATP, causando a inibição (RASMUSSEN et al., 1994).

Com a continuidade das pesquisas, a ACBP ficou sendo caracterizada como um domínio, sendo então nomeada como proteína com domínio de ligação ao acil-CoA (ACBD), no entanto, é compreendida hoje como uma grande família multigênica de proteínas intracelulares de ligação a lipídios, a qual pertence a ACBP, portanto, a proteína de domínio único independente pode ser citada como ACBP, ACBD1 ou DBI (NEESS et al., 2015).

A partir da análise dos genomas de uma variedade de espécies, observou-se que os homólogos de ACBP desenvolveram múltiplas isoformas na maioria dos eucarióticos examinados, com exceção dos fungos (FAERGEMAN et al., 2007; KRAGELUND et al., 1999). No entanto, existe o gene com domínio ACBP altamente conservado em organismos primitivos comum aos fungos, como as levedura (KNUDSEN et al., 1994; ROSE; SCHULTZ; TODARO, 1992).

Observa-se que a ACBP é uma proteína altamente conservada encontrada em todas as espécies eucarióticas, variando de leveduras a mamíferos, apenas ausentes nos procariotos, com exceção de algumas eubactérias (CHARMPILAS et al., 2020; KNUDSEN et al., 1999; NEESS et al., 2015). Por essa ampla gama de distribuição em todo o reino animal e vegetal e seu alto grau de conservação entre os diferentes tecidos, ela foi caracterizada como uma *housekeeping*, pois se trata de uma proteína fundamental para funções bioquímicas essenciais e comum a todas as células (FAERGEMAN et al., 2007; KNUDSEN et al., 2000).

Apesar da importância relatada até o presente momento, a função biológica da ACBP ainda não é totalmente conhecida, porém com o surgimento de pesquisas, em especial, envolvendo vários modelos de *knockout*, suas funções estão começando a surgir. Alguns dados sugerem fortemente que a ACBP é necessária para o alongamento da cadeia de ácidos graxos e a síntese de esfingolípídeos em eucariotos (NEESS et al., 2015). Mais recentemente, é abordado o papel filogeneticamente conservado da ACBP como estimulador do apetite. Os dados mostram que na autofagia ocorre a liberação de ACBP das células, agindo nos receptores da superfície celular para estimular os comportamentos alimentares, no entanto, foi observado efeitos distintos em ortólogos de ACBP em *S. cerevisiae* e *C. elegans*, abordando efeitos de ACBP intra e extracelular (CHARMPILAS et al., 2020).

Nos mamíferos, a maior concentração de ACBP é encontrada no fígado e distribuída uniformemente em todos os hepatócitos. Nos demais tecidos, a ACBP é mais presente em células especializadas, como células produtoras de esteróides do córtex adrenal e testículos, e em células epiteliais especializadas em secreção e no transporte de água e eletrólitos, sendo todas caracterizadas por um alto metabolismo energético (KNUDSEN et al., 1999)

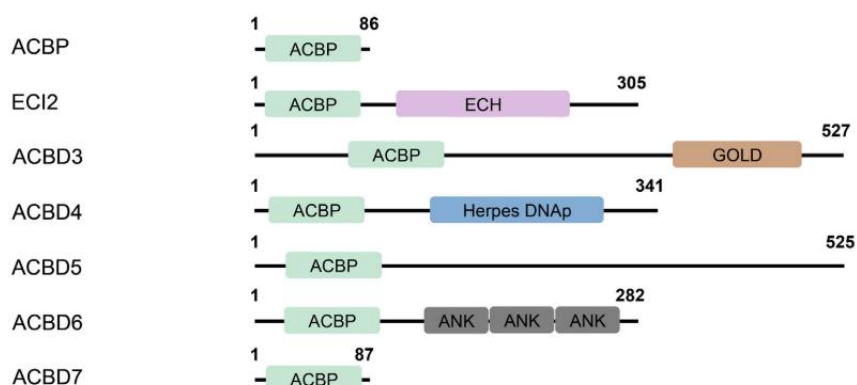
A ACBP é prevista estruturalmente com uma cadeia de 82 a 92 resíduos de aminoácidos, que pode variar dependendo da espécie (FAERGEMAN et al., 2007). Se liga a ésteres de acil-CoA de cadeia média e longa com afinidade muito alta, com preferência por acil-CoA de 14-22 carbonos, apresenta baixa afinidade para CoA (K_d 2 μ M), levando em consideração uma K_d de aprox. 0,5

nM para a ligação a palmitoil-CoA, e não se liga a ácidos graxos, acilcarnitinas, colesterol e nucleotídeos (FAERGEMAN; KNUDSEN, 1997; RASMUSSEN et al., 1994).

Dentre as isoformas descritas, quatro a sete foram detectadas em espécies de nematoides, artrópodes e animais vertebrados. Em espécies de mamíferos, foram identificadas três isoformas, com expressão tecidual diferente (FAERGEMAN et al., 2007; KNUDSEN et al., 1999). Em humanos, o domínio ACBP está presente em um total de 7 proteínas, as quais incluem: ACBP (ACBD1 / DBI), ECI2 (ACBD2), ACBD3 (GCP60 / PAP7), ACBD4, ACBD5 (inibidor da ligação ao diazepam associado à membrana), ACBD6 e ACBD7, apresentadas na **Figura 10**).

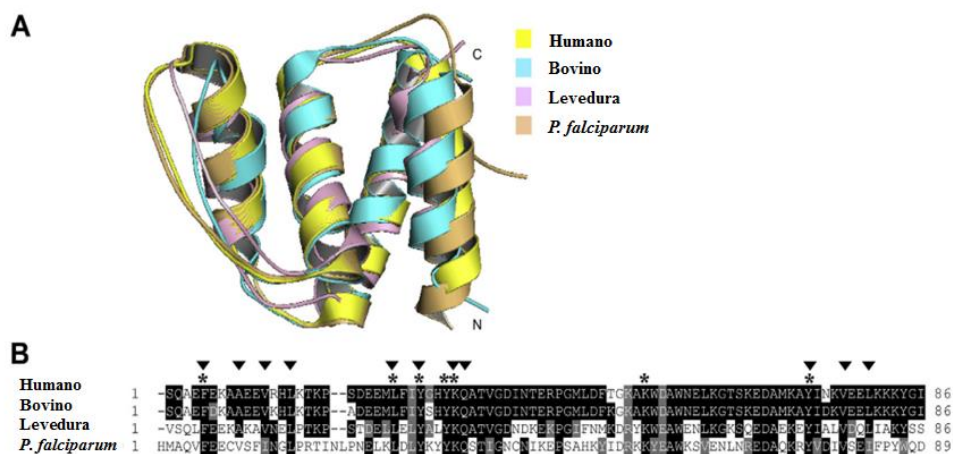
As estruturas de ACBP inicialmente estudadas em bovino, levedura, humanos e *P. falciparum* foram muito semelhantes e são representadas em estrutura tridimensional sobrepostas (**Figura 11**) (NEESS et al., 2015; VAN AALTEN et al., 2001), caracterizando a forte semelhança e alto grau de conservação entre as diferentes espécies.

Figura 10- Estrutura linear das sequências com o domínio de ACBDs humanos. Os domínios estão marcados em retângulos da cor verde (ACBP), rosa (domínio enoil-CoA hidratase / isomerase em ECI2), laranja (GOLD em ACBD-3), azul (fator acessório Herpes DNA replication- Herpes DNAp em ACBD4) e cinza (repetições ankirina no ACBP6).



Fonte: (NEESS et al., 2015)

Figura 11- Semelhança observada por sobreposição das sequências proteicas das ACBPs de Humano (amarelo); bovino (azul); Levedura (roxo) e *P. falciparum* (marrom). (A) alinhamento da estrutura tridimensional realizado pelo programa PyMOL, (B) alinhamento múltiplo das sequências. Os aminoácidos idênticos (em preto) e semelhantes (cinza) são identificados por sombreamento. Resíduos marcados com * e ▼ representam regiões do sítio de ligação da ACBP.



Fonte: Adaptado de NEESS et al., 2015.

A grande família multigênica que formam as ACBPs codificam proteínas de aproximadamente 10 kDa, ligando acil-CoA de forma não-covalente e reversível com alta afinidade e especificidade (FAERGEMAN; KNUDSEN, 1997). Algumas plantas e animais contêm genes que codificam a ACBP com mais de 10 kDa, e associado ou não a outro domínio no mesmo polipeptídeo (NEESS et al., 2015)

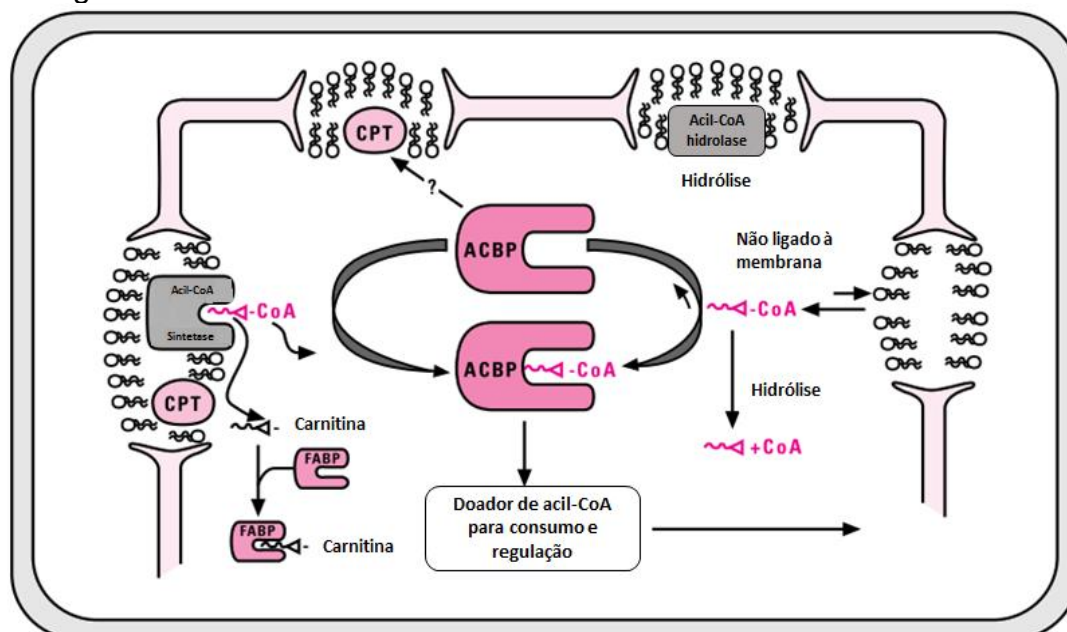
A estrutura tridimensional das ACBPs em geral são detectadas como uma proteína dobrada em quatro α -hélices, em conformação “up-down-down-up” (**Figura 11**) (KRAGELUND et al., 1999), porém com exceção da proteína descrita no fungo *Moniliophthora perniciosa*, cuja estrutura obtida através de difração de raio X apresenta cinco α -hélices (MONZANI et al., 2010). A variação estrutural de ACBPs de bovinos, insetos e leveduras mostra uma arquitetura quase idêntica de elementos helicoidais com variação conformacional apenas nas alças de conexão, que podem estar atrelado à especificidade de ligação e afinidade por diferentes ligantes (COSTABEL et al., 2006; VAN AALTEN et al., 2001).

O sítio de ligação está localizado em uma abertura hidrofóbica na superfície da ACBP, então o éster de acil-CoA liga a sua cadeia de acila hidrofóbica na cavidade de ligação ficando completamente protegida do meio

aquoso (KRAGELUND et al., 1999; TEILUM et al., 2005; VAN AALTEN et al., 2001). A região do grupo da cabeça de acil-CoA (porção adenosina-3'fosfato) forma uma cobertura na cavidade de ligação capaz de interagir com resíduos específicos na borda da ligação (COSTABEL et al., 2006). Essa região de ligação é bem conservada e indicada pelos principais aminoácidos para a ligação do acil-CoA (KRAGELUND et al., 1999).

As funções caracterizadas da ACBP em meio intracelular ocorrem a partir da sua capacidade de interagir e proteger a molécula de acil-CoA livre na célula. Dessa forma, sabe-se que a ACBP ao se ligar é capaz de estimular a atividade da acil-CoA sintetase, proteger a molécula de acil-CoA de hidrólise e a partição da membrana, isso leva a formação de uma aglomerado (*pool*) de acil-CoA de cadeia longa disponíveis para fins metabólicos e para sinalização específica (FAERGEMAN; KNUDSEN, 1997). A seguir, a imagem **Figura 12** ilustra resumidamente as funções relatadas para ACBP em meio intracelular.

Figura 12- Ilustração da ACBP e seu papel na célula. ACBP= proteína ligadora de acil-CoA; CTP= carnitina palmitoiltransferase ; FABP= proteína ligadora de ácido graxo.



Fonte: Adaptado de FAERGEMAN; KNUDSEN, 1997.

A relação da formação do complexo de ligação acilCoA/ACBP foi analisado numa proporção de 1:1, baseando-se no cálculo da concentração de acil-CoA de cadeia longa livre e da sua capacidade de ligação à ACBP, analisado em fígado de rato alimentado (FAERGEMAN; KNUDSEN, 1997; RASMUSSEN et al., 1994). No entanto, a concentração citosólica real de ésteres acil-CoA livres de cadeia longa não é conhecida de forma precisa para nenhum tecido (KNUDSEN et al., 2000). Mas espera-se que o direcionamento de acil-CoA ocorra no momento em que o complexo acil-CoA/ACBP esteja em razões molares abaixo de 1, podendo doar acil-CoA para os processos metabólicos, atuando como substrato enzimático (FAERGEMAN; KNUDSEN, 1997; KNUDSEN et al., 1999).

A localização intracelular da ACBP é predominantemente citosólica, distribuída uniformemente, e menos presente em compartimentos mais específicos como no núcleo e no retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e vesículas secretoras (KNUDSEN et al., 1989; SCHULTZ; PELTO-HUIKKO; ALHO, 1992). A localização também pode ser dinâmica e será regulada pela ligação ao ligando e pelo nível de acil-CoA, ou seja, vai depender do controle de substratos para processos de utilização de acil-CoA (NEESS et al., 2015).

Existem muitos estudos *in vitro* e *in vivo* que relatam o papel da acil-CoA de cadeia longa na regulação de diversos processos metabólicos na célula, mas a necessidade de se entender a função da ACBP na doação dessa molécula, levou a ampliação desses estudos para melhor compreensão *in vivo*.

Em insetos, a ACBP tem sido estudada em alguns organismos como a *D. melanogaster*, a qual foi o primeiro inseto em que foi descrito a ACBP (SNYDER; FEYEREISEN, 1993). Nesse modelo foi feita a clonagem e sequenciamento desses genes, verificando a expressão de seis diferentes isoformas basais de ACBP (KNUDSEN; BURTON; FAERGEMAN, 2003).

Além da *D. melanogaster* esse gene também foi identificado em *B. mori*, *A. aegypti* e *H. armigera* (KOLMER et al., 1994; LIU; ZHANG; XU, 2005; MATSUMOTO et al., 2001). Assim como nos vertebrados, ela é expressa nos tecidos com alta demanda metabólica e/ou grande taxa de metabolismo lipídico (FAERGEMAN et al., 2007).

Em *M. sexta* e *H. armigera* a expressão da ACBP apresentou um aumento nas células ecdasterogênicas do dia 1 ao dia 7 do quinto instar, e durante os tempos de alimentação ativa foi observado expressão de ACBP maior no intestino médio das larvas, indicando que essa proteína pode estar envolvida com a absorção de nutrientes da dieta e na regulação da síntese de hormônios na larva (SNYDER; ANTWERPEN, 1997). Em *B. mori* foram identificadas duas isoformas de ACBP, uma no intestino médio (mgACBP) e outra na glândula de feromônio (pgACBP). A partir da investigação nesse inseto, observou-se que na glândula, a síntese do feromônio bombykol ((E, Z) -10,12-hecadedecadieno-1-ol) ocorre a partir de palmitoil-CoA, indicando um papel para a ACBP na síntese de feromônios (MATSUMOTO et al., 2001). No mosquito *A. aegypti* a ACPB foi identificada no grupo de genes chave para as proteínas envolvidas na biossíntese de ecdisteróides pois aumentou significativamente nos ovários durante o pico de produção (SIEGLAFF; DUNCAN; BROWN, 2005).

Dados mais recentes de análise de expressão gênica em *R. prolixus*, mostram cinco ACBPs expressas com perfis de expressão característicos nos órgãos, sugerindo que eles têm papéis específicos na fisiologia dos insetos. O *knockdown* da RpACBP-1 nesse inseto, causou acúmulo de triacilglicerol no intestino posterior e uma redução no número de ovos depositados, indicando que o RpACBP-1 participa de várias etapas do metabolismo lipídico em *R. prolixus* (MAJEROWICZ et al., 2016). A regulação da expressão do gene para ACBP foi observada na presença de serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT), quando a injeção desse neurotransmissor foi liberada na hemolinfa ocorreu um aumento da expressão desse gene no intestino médio de fêmeas não alimentadas, atingindo níveis semelhantes aos observados em insetos alimentados, indicando um mecanismo regulador da transcrição desse gene em *R. prolixus* pela 5-HT (ALVES-BEZERRA et al., 2010a).

Estudos também relacionados à entrega de LCFA-CoA chegaram a hipótese de que a interação com a membrana é ditada pela interação eletrostática, impulsionada pelo aumento da carga negativa na superfície da membrana através da relação que ocorre com diferentes moléculas de LCFA-CoA e os fosfolípides na estrutura da ACBP dando novos insights sobre este importante processo (MICHELETTO et al., 2017).

A ACBP dos insetos é capaz de ligar acil-CoA, provavelmente da mesma maneira como funciona em outras células eucarióticas (MATSUMOTO et al., 2001; SNYDER; ANTWERPEN, 1997), o que facilita ainda mais os *estudos in vivo*. Os estudos ampliados em invertebrados, como *D. melanogaster* e *C. elegans*, demonstraram funcionar de forma muito parecida com em mamíferos na regulação da síntese lipídica, acumulação e catabolismo, devido à sua versatilidade genética e analogia funcional a organismos superiores, tornando uma excelente ferramenta para identificar e compreender novos genes e vias de sinalização na regulação da homeostase lipídica (ELLE et al., 2011).

A partir do *knockout* direcionado de ACBD1, uma ACBP clássica, analisado em camundongos, levou a letalidade embrionária na pré-implantação, esses dados corroboram com uma função essencial para sobrevivência celular e conseqüentemente para linhagens de células humanas (FAERGEMAN; KNUDSEN, 2002; LANDROCK et al., 2010). Esse retrato foi observado em *S. cerevisiae*, onde foi avaliado retardo de crescimento severo, função e montagem de organelas perturbadas e níveis reduzidos de ácidos graxos de cadeia muito longa, ceramidas e esfingolipídios (GAIGG et al., 2001). Embora a ACBP seja uma *housekeeping*, sua função celular precisa ainda está por ser elucidada. Existem poucas informações sobre a função da ACBP no metabolismo dos insetos, porém avanços com a utilização da técnica de RNA de interferência (RNAi) tem sido promissor.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

Identificar e caracterizar proteínas ligadoras de acil-CoA no inseto *Tribolium castaneum*

Objetivos específicos

1. Identificar os genes codificantes de proteínas homólogas às ACBPs no inseto *Tribolium castaneum* (*TcACBPs*);
2. Caracterizar as ACBPs do *T. castaneum* por análise *in silico*;
3. Avaliar a expressão do gene *TcACBP6* em diferentes tecidos e estádios de desenvolvimento do *T. castaneum* pela técnica de RT- qPCR;
4. Analisar a expressão gene *TcACBP6* em larvas de *T. castaneum* submetidas à dieta com um fármaco inibidor de lipase pancreática (Tetraidrolipstatina), e em dieta hiper-lipídica (*High Fat*).
5. Verificar a expressão relativa de genes relacionados às alterações metabólicas, como o gene de Sulfaquinina, receptor de insulina e peptídeo semelhante a insulina;
6. Silenciar o gene *TcACBP6* através de RNA interferente.

4 METODOLOGIA

4.1 Insetos e manutenção da colônia

Os insetos de estudo, *Tribolium castaneum*, são mantidos em nosso laboratório (Laboratório de Bioquímica Metabólica – LBM, no Instituto de ciências farmacêuticas, UFAL) em estufa com temperatura mantida em 30°C, umidade relativa entre 70 e 80%, e ciclo de luz (claro-escuro) em intervalo de 12h. Sua alimentação é mantida com farinha de trigo (nomeada “dieta base”).

A colônia é condicionada à manutenção de todas as fases de desenvolvimento, porém, a larva é a principal fase do ciclo aplicada neste estudo. A larva foi escolhida pelo seu metabolismo constante, em que há ingestão contínua de alimento.

4.2 Busca de genes codificantes de proteínas homólogas à ACBP no *T. castaneum*

A busca foi realizada através do banco de dados Ensembl Metazoa (<http://metazoa.ensembl.org/biomart/martview/>) com busca a partir do código de acesso do Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) para proteína ligadora de acil-Coa (Acesso: PF00887). Em seguida, com as sequências encontradas, foi realizada a pesquisa por domínios conservados para ACBP no Banco de Dados de Domínios Conservados (CDD - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

Para garantir o resultado dessa busca, o genoma do *T. castaneum* foi analisado com o algoritmo tBlastn (Altschul, Madden *et al.*, 1997), usando o código para a sequência primária da ACBD1p de *S. cerevisiae* (AAA34384) como isca (Rose, Schultz *et al.*, 1992). Em seguida, todas as sequências pesquisadas foram analisadas por alinhamento no Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

4.3 Análise *in silico* das sequências proteicas de ACBP no *T. castaneum*

Após a detecção das sequências de aminoácidos das ACBPs no *T. castaneum*, foi realizada uma continuidade de análises para caracterização delas por investigação bioinformática.

4.3.1 Predição de peptídeo sinal

Para a predição da presença de peptídeo sinal, as sequências foram submetidas no programa SignalP 4.0 (PETERSEN et al., 2011) que acusa a presença do peptídeo para endereçamento dessa proteína na célula.

4.3.2 Predição de Localização celular

A predição da localização celular ocorreu utilizando o programa PSORT II (NAKAI & HORTON, 1999) o qual informa a probabilidade de localização na célula, sendo considerado aqui as regiões de maior probabilidade.

4.3.3 Predição de sítios de fosforilação

A busca de possíveis sítios de fosforilação foi realizada utilizando o programa NetPhos 2.0 (BLOM et al., 1999). Essa investigação caracterizou os possíveis locais de fosforilação em resíduos de tirosina, serina e treonina que são os principais sítios de fosforilação nas sequências de proteínas.

4.3.4 Predição de domínio transmembrana

A pesquisa por domínio transmembrana foi conduzida por 4 programas: TMHMM 2.0 (KROGH et al., 2001), SOSUI (HIROKAWA et al., 1998), TMpred e

HMMTop (TUSNADY & SIMON, 2001), sendo considerado positiva, a presença em pelo menos 2 programas.

4.3.5 Estimativa de massa molecular e ponto isoelétrico

A massa molecular das ACBPs de *T. castaneum* identificadas e seus respectivos pontos isoelétricos teóricos foram obtidos através da análise de sequências no programa ProtParam (GASTEIGER et al., 2005).

4.3.6 Predição de estrutura tridimensional (3D) da TcACBP-6

A sequência de aminoácidos da ACBP selecionada (TcACBP6) foi enviada ao programa de predição estrutural I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) pelo qual foi selecionado o modelo com maior probabilidade de identificação com a sequência alvo. A estrutura selecionada foi visualizada pelo o programa PyMOL (software v. 2.0+) onde pode ser melhor analisada e capturada as imagens do sítio de ligação.

4.3.7 Análise filogenética

A árvore filogenética de relação evolutiva entre as proteínas da família ACBP foi construída através de sucessivas análises pelo método de Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987) e *Maximum Likelihood* (TAJIMA; NEI, 1984) com base no método *Equal Input mode*, utilizando 1000 repetições para os cálculos de “bootstrapping” no programa MEGA 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). Para a seleção da árvore foram levados em consideração as aproximações evolutivas e os valores de bootstrap.

Além das proteínas identificadas no *T. castaneum*, foram utilizadas as ACBPs presentes nos genomas de espécies das classe Insecta com o domínio ACBP já identificado, além de ACBP em *H. sapiens* (MAJEROWICZ et al., 2016).

4.4 Síntese dos iniciadores

Os iniciadores para amplificação por RT-qPCR foram desenhados baseados nas sequências das ORFs (quadros de leitura abertos) nas sequências de DNA das ACBPs de *T. castaneum* identificadas.

O desenho das sequências iniciadoras foi feito utilizando o programa Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (ROZEN & SKALETSKY, 2000) e posteriormente analisados no Programa OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

O gene de referência utilizado para quantificação relativa da expressão gênica, foi o gene codificante para Proteína Ribossomal 3 de *T. castaneum* (*TcasRPS3*). Este gene foi escolhido devido ao seu intenso uso em estudos de expressão gênica e por apresentar um perfil de expressão estável já comprovado em *T. castaneum*, principalmente em estudos entre estágios de desenvolvimento do inseto (TOUTGES et al., 2010). Um resumo dos iniciadores utilizados neste trabalho é apresentado na **Tabela 2**, que consta a descrição dos iniciadores, o números de acesso dos genes no NCBI e tamanho dos amplicons.

Tabela 2- Lista de todos os iniciadores usados para PCR.

Gene	Símbolo	Acesso	Sequência	Tamanho do amplicon (pb)
Golgi resident protein GCP60	TcACBP2	XP_972065	F- CATCGACGAATTCAAGCAGA	~200
			R- TCATCGCTTTTCAGAGACGTG	
Acyl-CoA-binding domain-containing protein 6	TcACBP5	XP_970549	F- ATTGGGCTGCAGATAGAGGA	~200
			R- GACGATATCCCGTCTTGCAT	
putative acyl-CoA-binding protein	TcACBP6	XP_974824	F- CCGCGTAAATACGTGTCCTT	~200
			R- CATCGTTGGAAGGCTTTGAT	
Proteína Ribossomal S3	TcasRPS3	NP_001165 863.1	F-CCGTCGTATTCGTGAATTGACTT	~200
			R-TCTAAGAGACTCTGCTTGTGCAATG	

4.5 Determinação da eficiência dos iniciadores

A concentração dos iniciadores ideal para melhor eficiência na amplificação foi realizada por várias concentrações dos iniciadores, dentro da faixa recomendada pelo fabricante. Assim, as reações de amplificação foram otimizadas utilizando 0,2µM de cada um dos iniciadores (senso e anti-senso) e 33nM de *CXR Reference Dye* pelo kit de PCR (Kit *GoTaq® 1-Step RT-qPCR System*).

4.6 Determinação da eficiência de amplificação e análise da curva de dissociação

A determinação da eficiência de amplificação em experimentos de RT-qPCR é de fundamental importância. Os cálculos realizados para obtenção dos níveis de expressão relativa ocorreu através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) que levam em consideração que as reações de amplificação estão ocorrendo com eficiência de amplificação dentro do intervalo de 90-110%.

Para determinação da eficiência de amplificação, foram geradas as curvas-padrão baseadas em cinco pontos de diluições 1:2 (20ng, 10ng, 5ng, 2.5ng, 1.25ng) do RNA. Para isso, utilizou-se o valor de CT (*threshold cycle*) obtido em cada diluição versus o log das respectivas diluições. A partir da correlação entre esses dois fatores, as eficiências de amplificação (E) foram determinadas através da fórmula:

$$E = [10^{(-1/\text{slope})} - 1] \times 100,$$

em que slope é a inclinação da reta obtida.

A eficiência de amplificação geralmente é calculada através da variação da concentração de cDNA utilizada na amplificação. Porém, como o reagente utilizado neste trabalho faz transcrição reversa e amplificação em uma só etapa,

pois usa como molde o RNA, consideramos a margem de eficiência dentro do intervalo 90-120%, mostrado na **Tabela 3**.

Tabela 3- Eficiência de amplificação dos genes analisados por qPCR

Gene	Amplicon (Pb)	Concentração do Primer	Slope (inclinação da curva)	Intercept	Eficiência	R ²
<i>TcACBP-2</i>	~200	0,2μM	-2.8407	35.617	124.91%	0,9725
<i>TcACBP-5</i>	~200	0,2μM	-2.7266	28.981	132.67%	0,9956
<i>TcACBP-6</i>	~200	0,2μM	-3,4568	19,44	94,66%	0,9938

Para avaliar a especificidade de amplificação das reações e a possível formação de dímeros, foi realizada a curva de dissociação (curva de *Melt*). A presença de um único pico garantiu a ausência de amplificações inespecíficas ou de formação de dímeros de primers.

4.7 Análise de expressão gênica nos tecidos

Inicialmente foi feita a análise em todas as fases de desenvolvimento (ovo, larva, pupa e adulto), e em seguida nos tecidos (corpo gorduroso e intestino). Em determinados estádios de desenvolvimento, os insetos foram dissecados para separação dos tecidos e sempre em tampão PBS (Tampão Fosfato Salino, 1x, pH 7,4). Os tecidos submetidos para análise seguiram os seguintes procedimentos:

4.7.1 Extração de RNA total

Os tecidos foram homogeneizados em 500 µl de reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, EUA) em tubos de microcentrifuga e incubados a temperatura ambiente por 5min. Depois, as amostras foram centrifugadas a 13000 g por 15 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e a eles foram adicionados 200 µl de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha). As amostras foram incubadas por 2 min a temperatura ambiente e depois novamente centrifugadas a 13000 g por 15 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e foram adicionados 500 µl de isopropanol (Merck). As amostras foram incubadas por 10 min a temperatura ambiente e depois centrifugadas a 13000 g e 4 °C por mais 15 min. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados resuspenso em 200 µl de etanol absoluto (Merck), quando as amostras foram então estocadas. O RNA deve ser guardado a pelo menos -70 °C até o uso. Para uso imediato, as amostras de RNA foram ressuspensas em 20 µl de H₂O-DEPC 0,1% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA).

4.7.2 Quantificação de RNA

As amostras de RNA foram quantificadas em espectrofotômetro L-quant (Loccus, Cotia, BRA). As quantificações foram realizadas no Laboratório de Biologia Integrativa da Universidade Federal de Alagoas, coordenado pela Profa. Tamí Mott. As amostras de RNA também foram avaliadas quanto à pureza por análise da razão entre a absorbância observada no comprimento de onda de 260nm e 280nm. As amostras foram consideradas próprias para uso quando a razão 260/280 foi maior que 1.8 e menor que 2 (LEHNINGER et al., 2004). A partir da definição da concentração de cada extrato de RNA total, as amostras foram diluídas para uso em 20ng de RNA em cada reação de PCR. Todos os experimentos foram padronizados utilizando 20ng de RNA em cada reação.

4.7.3 Tratamento com DNase

As amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Thermo Fisher Scientific). Para isso, foram adicionados em um tubo de 0,2 mL no gelo, 1 µg de RNA total, 1 µL do tampão da DNase I (10x), 1 µL de DNase I (1 U/µL) e H₂O-DEPC 0,1 % em quantidade suficiente para completar 10 µL. Em seguida as reações foram incubadas por 30 min a 37 °C e depois foi adicionado 1 µL de EDTA 25mM. E então, incubadas a 65 °C por 10 min.

4.7.4 Síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese de cDNA, utilizou-se o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, EUA). A partir de 11 µL obtidos no tratamento das amostras com DNase I (no item 4.7.3) foram adicionados 2,2 µL do tampão de reação (10x), 0,88 µL de dNTP (100 mM), 2,2 µL de iniciadores aleatórios (10x), 1,1 µL da transcriptase reversa (50U/µL) e H₂O-DEPC 0,1% para completar 22 µL. As reações foram incubadas por 10 min a 25°C e depois a 37 °C por 2 h. As amostras de cDNA foram estocadas no freezer a -20°C até o uso.

4.7.5 Reação de polimerase em cadeia (PCR)

As reações de PCR utilizaram a enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen). As misturas de reação para PCR continham 5 µl de tampão para Taq DNA Polimerase, 4 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl de dNTP (10 mM), 0,4 µl do iniciador senso (15 µM), 0,4 µl do iniciador anti-senso, 0,2 µl da enzima Taq DNA Polimerase (5 U/µl), 1 µl do cDNA (5x) produzido a partir de RNA dos tecidos do *T. castaneum* como descrito nas seções anteriores e H₂O Milli-Q autoclavada para completar um volume final de 20 µl de reação. As amostras foram levadas ao termociclador sob o programa: 94 °C por 2 min; 30 ciclos de 94 °C por 30 seg, 58 °C por 30 seg e 72 °C por 30 seg; e 72 °C por 10 min. Ao fim, foram analisadas em eletroforese no gel de agarose 2%.

4.7.6 Eletroforese em gel de agarose

Para verificar o resultado da amplificação do PCR, assim como a integridade do RNA total obtido, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (USB, Cleveland, EUA) 1% (para RNA) ou 2% (para DNA) corado com brometo de etídio (USB) 0,2 µg/mL em tampão TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) a 80 V constantes por 30 min. Terminada a eletroforese, as bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta em transiluminador UV e os géis foram fotografados.

4.7.7 Reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-qPCR)

As reações de RT-qPCR foram realizadas utilizando o Kit *GoTaq® 1-Step RT-qPCR System* (Promega, Madison, EUA), segundo instruções do fabricante. Todos os experimentos foram realizados no equipamento *StepOnePlus™ Real-Time qPCR System* (Applied Biosystems, Foster city, EUA) do Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal de Alagoas, sob coordenação do Prof. Daniel Leite Góes Gitaí.

Em cada reação de qPCR foram adicionados 10µL de *GoTaq® qPCR Master Mix 2x*, 0.2µM de cada um dos iniciadores (senso e anti-senso), 0.4µL de *GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR 50x*, 20ng de RNA, 33nM de *CXR Reference Dye* e água livre de nuclease para completar o volume total de 20µL da reação. O programa termociclador utilizado para a reação de *RT-qPCR 1-Step* seguiu as seguintes condições: 15 minutos à 37°C para transcrição reversa; 10 minutos à 95°C para inativação da Transcriptase Reversa; 40 ciclos de 10 segundos à 95°C (desnaturação), 30 segundos à 60°C (anelamento) e 30 segundos à 72°C (alongamento). E por fim, a dissociação através da curva de *Melting* (60-95°C). Os fragmentos produzidos nas reações de RT-qPCR tem aproximadamente 200pb. Todos os pontos experimentais foram feitos em triplicata e os brancos foram feitos utilizando água livre de nuclease ao invés de RNA. O número de ciclos de PCR em que a fluorescência atingiu o limiar

(*threshold*) na curva de amplificação –*threshold cycle* (Ct) – foi determinado automaticamente pelo programa *StepOnePlus*[™] (Applied Biosystems).

4.8 Análise dos dados

Os valores de $\Delta\Delta Ct$ e de quantidade relativa expressão foram calculados a partir dos valores de Ct (“*threshold cycle*”, que é o número de ciclos necessários para produzir uma quantidade de fluorescência definida), obtidos através do PCR em tempo real, segundo (NORGARD et al., 2006). Esses valores foram utilizados para as análises estatísticas específicas de cada experimento (teste t de Student, ou ANOVA de uma ou duas vias) conforme indicado nas legendas das figuras. Os valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) foram utilizados apenas para montagem dos gráficos.

4.9 Dieta com tetraidrolipstatina

O fármaco tetraidrolipstatina foi incorporado em discos de farinha de trigo (dieta base), conforme descrito por Xie et al. (1996). Grupos de 30 larvas com 15 dias de idade (L15) foram colocados em placas de Petri (60 x 15mm) com disco de farinha incorporado com fármaco (concentração final 0,1mg tetraidrolipstatina/mg de farinha). Para controle negativo, foi utilizado os discos somente com farinha de trigo. Os experimentos foram realizados em triplicada e em pelo menos 3 determinantes independentes.

4.10 Dieta hiper-lipídica (*High-Fat*)

Para uma dieta com alto teor de gordura, foi incorporado óleo de oliva em 15% do discos de farinha de trigo. Esse experimento seguiu os mesmos critérios de preparo em dieta com a tetraidrolipstatina (item 4.9). Seguindo com grupos de 30 larvas com 15 dias de idade (L15) em placas de Petri (60 x 15mm) com disco de farinha incorporado com o óleo. Para controle negativo, foi utilizado

discos somente com farinha de trigo. Os experimentos foram realizados em triplicada e em pelo menos 3 determinantes independentes.

4.11 Controle de mortalidade

Nas duas dietas aplicadas (com tetraidrolipstatina e óleo de oliva) foi realizado ao longo do experimento, a análise de mortalidade pela contagem de larvas vivas e mortas a cada 24 horas, acompanhados nos tempos de 0h, 24h, 48h, 72h, 96h (XIE; BODNARYK; FIELDS, 1996). Os dados de mortalidade observados foram utilizados para traçar a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier.

4.12 Índices nutricionais

Ao longo do experimento com as dietas, os índices nutricionais foram calculados a partir das fórmulas de Taxa de crescimento relativo (RGR), Taxa de consumo relativo (RCR) e Eficiência de conversão de alimento ingerido (ECI) (XIE; BODNARYK; FIELDS, 1996).

RGR = mg de biomassa ganha / mg de biomassa inicial do inseto x dia

RCR = mg de biomassa ingerido / mg de biomassa inicial do inseto x dia

ECI (%) = biomassa ganha / alimento ingerido x 100

Para identificar o valores de biomassa e alimento ingerido, foram aferidas as massas das larvas e do alimento em balança analítica a cada 24 horas, acompanhados nos tempos de 0h, 24h, 48h, 72h, 96h (XIE; BODNARYK; FIELDS, 1996). As larvas, tanto do grupo controle quanto do tratamento, após o acompanhamento por 96h foram utilizadas para extração de RNA total e as amostras foram submetidas ao RT-qPCR para determinar a expressão gênica das ACBPs e de genes envolvidos na sinalização (TcasIn1, TcasIn2, TcasSK, TcasInR). O perfil de expressão dos genes foi comparado entre as larvas do grupo controle e as larvas tratadas após 96h.

4.13 RNA interferente (RNAi)

Os experimentos que conduziram o silenciamento de genes por RNAi foram realizados em parceria com o Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) sob orientação da Profa. Dra. Kátia Calp Gondim e Prof. David Majerowicz.

Para a realização da técnica, foi produzido o RNA dupla fita (dsRNA) que cobria toda a sequência de leitura aberta (ORF) do gene da TcACBP6 (dsTcACBP6), e para fim de análise comparativa e efetividade do silenciamento, foi produzido um dsRNA para um controle não-relacionado homólogo a uma proteína ligadora de maltose de *Escherichia coli* (dsMal). A seguir são apresentados os experimentos para a síntese do dsRNA e a sua administração no inseto.

4.13.1 Síntese dos iniciadores com T 7

Para a produção do molde de DNA necessário para a síntese do dsRNA específico, foram utilizados pares de iniciadores específicos associados ao iniciador T7minimal (5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG G - 3'). Os iniciadores foram desenhados utilizando o programa Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) a partir da sequência ORF específica da TcACBP6, mostrado na **Tabela 4** e sintetizados pela empresa DNA Express Biotecnologia (Guarulhos, São Paulo).

Tabela 4- Sequências de iniciadores utilizados para síntese do dsRNA

Gene	Iniciadores	Sequência
<i>dsTcACBP6</i>	Senso	T7 - GGAAATTTACGCTTTATTTA
	anti-senso	T7 - TTATTGTAAACCGATGGAT

4.13.2 Produção do molde de DNA

A partir dos iniciadores, foram realizadas reações de PCR convencional com programação de ciclo de temperatura otimizado para melhor rendimento do molde de DNA. As reações de PCR utilizaram a enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen). As misturas de reação para PCR continham 5 µl de tampão para Taq DNA Polimerase, 4 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl de dNTP (10 mM), 0,4 µl do iniciador – T7 senso (15 µM), 0,4 µl do iniciador – T7 anti-senso (15 µM), 0,2 µl da enzima Taq DNA Polimerase (5 U/µl), 1 µl do cDNA (5x) produzido a partir de RNA de larvas de 20 dias de *T. castaneum* como descrito nas seções anteriores e H₂O Milli-Q autoclavada para completar um volume final de 50 µl de reação. As amostras foram levadas ao termociclador sob o programa: 95 °C por 2 min; 5 ciclos de 94 °C por 30 seg, 41 °C por 30 seg e 72 °C por 30 seg; 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 50-60 °C por 30 seg e 72 °C por 30 seg; e 72 °C por 10 min. Ao fim a qualidade dos produtos de PCR foi checada por eletroforese em gel de agarose 2 %.

4.13.3 Purificação dos produtos do PCR

As bandas do gel foram visualizadas sob luz ultravioleta em transiluminador UV e o gel foi fotografado. As bandas foram excisadas do gel e purificadas com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Fitchburg, EUA) seguindo as orientações do fabricante.

Outra forma eficaz que concentrar o produto do PCR, foi por meio de precipitação. Com a banda do gel ou ~200 µl do produto de reação, misturou-se 2 volumes de etanol absoluto, 1/10 do volume de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e foi incubado a -20°C por 1h. Em seguida, foi centrifugado a 13.000g por 15 minutos a temperatura de 4°C. O precipitado foi ressuspenso em 10 µl de água Mili-Q autoclavada.

4.13.4 Quantificação das amostras de DNA

As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria em Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) e utilizadas para síntese do dsRNA.

4.13.5 Síntese de dsRNA

O dsRNA foi produzido com o kit MEGAScript® RNAi Kit (Ambion, Austin, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. As etapas podem ser resumidas em transcrição, anelamento, tratamento com nucleases e purificação.

Em um tubo de 0,2 ml no gelo, foram adicionados de 2 µg de produto de PCR como molde de DNA do gene a ser silenciado, 2 µl de tampão para T7 RNA Polimerase (10x), 2 µl de ATP (75 mM), 2 µl de UTP (75 mM), 2 µl de CTP (75 mM), 2 µl de GTP (75 mM), 2 µl da enzima T7 RNA Polimerase e H₂O-DEPC 0,1% suficiente para completar um volume final de 20 µl. A seguir a reação foi incubada por 16 horas a 37°C. Após essa incubação, a reação foi aquecida a 75 °C por 5 min e resfriada a temperatura ambiente para maximizar a formação de dupla-fita. Após essa etapa, foram adicionados ao tubo 5 µl de tampão de nucleases (10x), 2 µl de DNase I (2 U/µl), 2 µl de RNase e H₂O-DEPC 0,1% suficiente para completar um volume final de 50 µl. A reação foi então incubada a 37 °C por 1 hora. Após a digestão com as nucleases, a reação foi transferida para um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml e a ela foram adicionados 50 µl do tampão de ligação (10x), 250 µl de etanol absoluto e H₂O-DEPC 0,1% para completar um volume final de 500 µl. A amostra foi transferida para a coluna de purificação do kit e centrifugada a 14000 g por 2 min a temperatura ambiente. A coluna foi então lavada duas vezes com tampão de lavagem através de centrifugação a 14000 g por 2 min a temperatura ambiente. O dsRNA foi eluído da resina da coluna com 100 µl de H₂O-DEPC 0,1% e aquecida a 95 °C e centrifugação a 14000 g por 2 min a temperatura ambiente. O procedimento foi repetido duas vezes, totalizando uma eluição com 200 µl de volume final.

As alíquotas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5% e as bandas visualizadas sob luz ultravioleta em transiluminador UV comprovando a integridade e eficiência da síntese do dsRNA. As amostras de dsRNA foram então quantificadas por espectrofotometria em Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific), evaporadas totalmente em liofilizador a vácuo e ressuspensas em tampão de eluição (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) até a concentração de 2,17 µg/µl para injeção, ou 1 µg/µl para estoque e conservadas a -20 °C até o uso.

4.13.6 Injeção do dsTcACBP6 em larvas de *T. castaneum*

A injeção do dsRNA específico para TcACBP6 foi realizada utilizando o microinjetor Nanoject II (Drummond Scientific Company, Pensilvânia, EUA). Foram aplicados 0,15µg de dsRNA em 69 nanolitros no 3º segmento dorsal das larvas com 20 dias de idade (L20). As larvas injetadas foram acompanhadas a fim de observar alterações fenotípicas, e todas as análises foram realizadas 3 dias após a injeção, conforme descrito por Alves-Bezerra et al. (2016). Após 3 dias da injeção, as larvas foram submetidas a extração do RNA total conforme descrito anteriormente e avaliado o efeito da inibição da expressão gênica do TcACBP6 por RT-qPCR.

4.14 Medida de β-Oxidação

O efeito do silenciamento foi avaliado no ensaio de β oxidação que foi realizado nas amostras de larvas inteiras maceradas em 100 µl de PBS e em seguida diluídas em 140 µl de meio de reação (70µl de Tris-HCl 75 mM, pH 7,4, 2,8µl de MgCl₂ 2 mM, 28 µl de albumina 2 mg/mL, 7 µl de ATP 5 mM, 7 µl de DTT 5 mM, 0,28 µl de CoA 0,2), onde foi adicionado 20 µl de L-carnitina 10 mM, 5 µl de palmitato 20 mM (0,04 µCi/µl H³-palmitato (Perkin-Elmer) para volume final de 200 µL. A reação foi incubada a 28°C por 30 min, e interrompida pela adição de 63µL de ácido tricloroacético 12% gelado, e incubado a 4°C por ao menos 16 h para precipitação da albumina conjugada ao palmitato não oxidado.

Após as 16h, foi feita a separação das fases por adição de 600µl de água destilada, 1ml de metanol e 2 de clorofórmio e em seguida vortex por 2 min. e centrifugação por 15min. a 13.000 rpm (BLIGH e DYER, 1959). Foram coletados 100 µL da fase aquosa e transferido para vials específicos. A radioatividade associada à fração aquosa foi determinada por contagem em cintilador líquido na presença de 2 mL de Optiphase Hisafe 3 (Perkin-Elmer).

4.15 Quantificação de Triacilglicerol (TAG)

Os tecidos utilizados para essa quantificação foram macerados em 400µL de salina 0,9% e o homogenato foi centrifugado por 15 minutos a 10.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante e o *fat cake* formado foram retirados, homogeneizados e utilizados como amostra para as dosagens de TAG. Essas amostras foram então quantificadas quanto à concentração de proteínas pelo método de Bradford (1976), a fim de normalizar as análises da concentração de TAG por quantidade de proteína. Dessa forma, o volume correspondente a 20µg de proteína de cada extrato foi utilizado. A quantificação do TAG foi realizada através de kit comercial (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, BR), segundo orientações do fabricante. As amostras foram incubadas com o reagente analítico à 37°C por 10 minutos em placas de 96 poços. Em leitora de microplacas *Flex Station 3* (Molecular Devices, California, EUA) foi feita a análise no comprimento de onda de 505nm. Os valores de absorbância obtidos foram aplicados em equações da curva padrão para esse kit. Todas as dosagens foram realizadas em triplicata e com o branco. Os valores de concentração de TAG foram expressos no gráfico como mg de TAG/mg de proteína.

4.16 Quantificação da atividade da enzima lipase

Foi verificada a atividade da enzima lipase de acordo com CHOI; HWANG; KIM (2003) em tecidos de intestino e corpo gorduroso das larvas. Para isso, foi adicionado 200µl do substrato (tecido homogeneizado em PBS 1x) em mistura reacional padrão (20 µl de DMPTB 10 mM, 20 de DTNB 40 mM, 2 de EDTA 0,5

M, 5 de Triton X-100 a 10% e 50 de Tris-Cl 1 M, pH 7,5, completado com 803µl de água deionizada para perfazer um volume final de 900). A lipase de *Candida rugosa* (Sigma L1754, 724 U / mg de proteína, St. Louis, EUA), utilizada como padrão, foi diluída com tampão L (10 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, pH 7,5).

Os poços da microplaca foram preenchidos com 10µg da enzima e completados para 200 µl desta mistura com substrato. Para a detecção específica da atividade lipase em extratos brutos teciduais, foi utilizado um branco que não continha DMPTB. A microplaca foi transferida imediatamente para uma incubadora de 37 °C para iniciar a reação. Após o período de incubação, mediu-se a absorbância de cada poço a 405 nm utilizando um leitor de microplacas *Flex Station 3* (Molecular Devices, California, EUA).

4.17 Análise do estresse oxidativo

4.17.1 Permeabilização de mitocôndrias de corpo gorduroso

Para permeabilização química e mecânica, o conteúdo de corpo gorduroso de 15 larvas por grupo (aproximadamente 11,5 g) foram extraídos manualmente e colocado sob agitação magnética (aproximadamente 100 rpm) em gelo por 20 minutos com 6 ml de BIOPS (10 mM Ca-EGTA; 20 mM imidazole; 20 mM taurine; 50 mM MOPS; 6.56 mM MgCl₂; saponin 0.05 mg / mL; pH 7.1). Após esse período, o sobrenadante foi separado do precipitado.

4.17.2 Produção estimada de espécies reativas de oxigênio (ERO)

A geração de ERO foi monitorada por análise espectrofluorimétrica (Shimatsu RF5300). Inicialmente, foi realizada a permeabilização química e mecânica de tecido de corpo gorduroso de 15 larvas em meio BIOPS (ver item 4.9.3).

O sobrenadante foi transferido para o fluorímetro com 950 µL do meio de reação padrão (composto por 0,5 mM de Ca-EGTA; MgCl₂ 3 mM; MOPS de 60

mM; Taurina 20 mM; KH₂PO₄ 10 mM; HEPES 20 mM; Sacarose 110 mM; BSA a 4%; pH 7,2 a 37° C), succinato 5 mM, ADP 250 µM e a sonda H₂- DCFDA (diacetato de diclorodi-hidrofluoresceína) 1 mM.

O H₂-DCFDA - 1mM (LEBEL et al., 1992) teve sua fluorescência monitorada no comprimento de onda de excitação em 488 nm e emissão em 525 nm, com uma largura de ranhura de 5 nm. A calibração foi realizada adicionando concentrações conhecidas de diclorofluoresceína (DCF), o produto de oxidação do H₂-DCFDA.

4.18 Visualização das gotículas lipídicas por coloração com vermelho do Nilo

Foi inicialmente isolado o corpo gorduroso de 1 a 3 larvas do grupo de análise. O tecido foi corado conforme metodologia adaptada de Alves-Bezerra (2017). O tecido foi incubado por 15 min em vermelho do Nilo a concentração de 20 µg/ml (Sigma-Aldrich) e DAPI em 40 µg/mL (Sigma-Aldrich) em solução de glicerol a 75%. Em seguida, a solução corante foi retirada delicadamente e adicionado solução de glicerol 100%, e coberto por lamínula para leitura. As imagens foram captadas por microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS-SPE. Os comprimentos de onda de excitação utilizados foram 532 nm para o Vermelho Nilo e 405 nm para DAPI. As pilhas Z foram obtidas de 20 a 25 seções ópticas (1,5 µm cada) usando uma objetiva 30 x, e as regiões periféricas dos corpos gordurosos foram analisadas. Os diâmetros médios das gotículas lipídicas foram obtidos a partir de uma imagem representativa de cada grupo de insetos, utilizando o software de análise de imagem DAIME após segmentação automática da detecção de bordas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Busca dos genes codificantes de proteínas homólogas à ACBP no *Tribolium castaneum*

A busca pelos genes da família ACBP no genoma do *T. castaneum* foi realizada a partir da sequência de domínio consenso para ACBP no banco de dados do Pfam identificando o código de acesso “PF00887”. Este foi utilizado na investigação das sequências gênicas de ACBP no *T. castaneum* pelo programa de base de dados genômico, Ensembl Metazoa, com pesquisa de dados no bioMart (Metazoa Mart), o qual tornou existente 5 sequências de ACBPs identificadas no inseto. Para garantir que nenhum gene codificante não tenha sido encontrado pelo banco de dados Ensembl Metazoa, foi prosseguida análise com o código da sequência primária da ACB1p de *S. cerevisiae* (AAA34384) com o algoritmo tBlastn no genoma do *T. castaneum*.

Foram então identificadas 6 sequências distintas codificantes para ACBP no *T. castaneum*. As sequências foram confirmadas através da investigação no Banco de Dados de Domínios Conservados (CDD) que identificou a presença dos domínios conservados para ACBP em todas as sequências, as quais estão descritas na **Tabela 5**. A análise bioinformática e todos os estudos de expressão foram conduzidos baseados em apenas 3 genes, onde inicialmente foi utilizado a TcACBP6 para as primeiras análises de expressão gênica e em seguida sua relação com a TcACBP 2 e 5.

Tabela 5- Sequência de proteínas homólogas à ACBP no *T. castaneum*. A tabela apresenta a nomenclatura adotada pelo autor, com seu gene específico e número de acesso pelo Genbank.

NOMENCLATURA	GENE	NÚMERO DE ACESSO
TcACBP1	<i>Putative acyl-CoA-binding protein</i>	XP_974813
TCACBP 2	<i>Golgi resident protein GCP60</i>	XP_972065
TCACBP 3	<i>Hypothetical protein TcasGA2_TC009203</i>	EFA06332
TCACBP 4	<i>Acyl-CoA-binding domain-containing protein 5A</i>	XP_001811313
TCACBP 5	<i>Acyl-CoA-binding domain-containing protein 6</i>	XP_970549
TCACBP 6	<i>Putative acyl-CoA-binding protein</i>	XP_974824

Se compararmos com humanos, o *T. castaneum* apresenta 6 de um total de 7 proteínas ACBPs identificadas em humanos (FAN et al., 2010; NEESS et al., 2015). Uma variedade bem comum quando analisamos as descrições da ACBP para outros organismos, mas com diferentes expressões nos tecidos. Podemos entender melhor a representação dessas ACBPs no *T. castaneum* por análise de predição bioinformática e discutindo suas relações com as sequências já descritas em estudos anteriores.

5.2 Análise *in silico* das sequências de ACBP no *T. castaneum*

5.2.1 Análise de predição bioinformática

Existem múltiplas isoformas de ACBPs que podem ser encontradas em grande parte dos organismos eucarióticos (MAJEROWICZ et al., 2016). Com

isso, a análise bioinformática para as sequências identificadas no genoma do *T. castaneum* propôs caracterizar inicialmente cada uma delas.

A predição de localização celular sugeriu duas ACBPs citoplasmáticas (TCACBP-2; TCACBP-5) enquanto as demais (TCACBP-1; TCACBP-3; TCACBP-4; TCACBP-6) apresentaram provável localização nuclear e pequena porcentagem indicando possível localização citoplasmática.

A pesquisa por domínios transmembrana nas sequências de aminoácidos sugeriu a presença de uma proteína transmembrana em TcACBP-3 e TcACBP-4, confirmado nos 4 programas de análise de domínio transmembrana (TMHMM 2.0, SOSUI, Tmpred e HMMTop).

Em células eucarióticas, a maioria da fosforilação de proteínas ocorre em resíduos de tirosina, serina e treonina, permitindo a participação em várias vias de transdução de sinais (AOYAMA et al., 2003). Nas sequências de ACBP em *T. castaneum*, todas indicaram predição de sítios de fosforilação para serina, treonina e tirosina pelo programa NetPhos 2.0 Server, e de acordo com a ferramenta de predição SignalP 4.1, não foi evidenciada a presença de peptídeo sinal para endereçamento das sequências. A análise das sequências de aminoácidos no programa ProtParam estimou os valores de massa molecular e seus pontos isoelétricos resumido na **Tabela 6**, evidenciando diferenças significativas entre as sequências.

Tabela 6- Resumo da análise bioinformática das sequências de aminoácidos das ACBPs do *T. castaneum*. Estimativa de valores de massa molecular e ponto isoelétrico teórico (ProtParam); predição de sítio de fosforilação (Netphos 2.0 server); detecção de peptídeo sinal (SignalP 4.1); domínio transmembrana (TMHMM 2.0, SOSUI, TMPred e HMMTop).

TcACBPs	Massa Molecular(KDa)	Ponto isoelétrico(pI)	Predição de sítios de fosforilação	Detecção de peptídeo sinal	Domínio Transmembrana
TcACBP1	9,5	9,38	Ausente	Ausente	Ausente
TcACBP2	51,0	5,03	Ausente	Ausente	Ausente
TcACBP3	101,6	6,13	Ausente	Ausente	<i>Presente</i>
TcACBP4	31,3	6,16	Ausente	Ausente	<i>Presente</i>
TcACBP5	28,1	4,66	Ausente	Ausente	Ausente
TcACBP6	9,9	7,77	Ausente	Ausente	Ausente

A localização celular é predominantemente citoplasmática para a maioria das ACBPs relatadas. A isoforma L-ACBP, identificada em mamíferos, tem sido relatada preferencialmente no citoplasma com acesso ao compartimento nuclear, porém nem sempre pode ser distribuída uniformemente no citosol, pois pode estar associada a compartimentos/proteínas específicos, vesículas citoplasmáticas, vesículas sinápticas, núcleos ou mitocôndrias (FAERGEMAN et al., 2007). Portanto a predição de localização nuclear para TcACBP-1; TcACBP-3; TcACBP-4 e TcACBP-6, não atrela a sua função necessariamente ao núcleo.

A partir das observações feitas a respeito da localização celular pode-se afirmar que ela é dinâmica e pode ser regulada pela ligação ao ligante e pelo nível de acil-CoA, e por isso pode depender também do fluxo metabólico celular de ácidos graxos (NEESS et al., 2015). Em *M. sexta* foi revelado que ACBP tem localização citosólica em células intestinais e células ecdisteroidogênica da glândula protorácica, porém também podem se localizar no nucléolo e mitocôndria, a depender de seu estágio de desenvolvimento (SNYDER; ANTWERPEN, 1997).

A frequência de ACBP com domínio transmembranar, como foi sugerido para TcACBP-3 e TcACBP-4 nas análises bioinformáticas, não é comum. Apenas em poucos organismos é possível observar. Em *R. prolixus* o RpACBP-3 contém uma região com características do domínio transmembranar C-terminal. Em *C. elegans*, a deleção desse gene altera o tráfego e a morfologia do endossoma, mas não há dados sobre alterações no metabolismo lipídico (LARSEN et al., 2006). Apenas em *Arabidopsis thaliana*, uma planta herbácea da família das Brassicaceae, demonstraram por análise de western blot com anticorpos anti-ACBP2 que a ACBP2 está localizada na fração de membrana contendo microsomas e na fração subcelular com partículas grandes (mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos), assemelhando-se à localização subcelular da ACBP1 no mesmo organismo (LI; CHYE, 2003).

No entanto poucos detalhes são conhecidos sobre esta proteína. Em animais, sabe-se que a interação membranares das ACBPs ocorre através de compostos lipídicos específicos da membrana ou por proteínas que residem nela (MICHELETTO et al., 2017). Dessa forma a predição estabelecida por estas ferramentas bioinformáticas não são tão conclusivas para a presença de domínio transmembrana na TcACBP-3 e TcACBP-4.

5.2.2 Alinhamento e identificação de domínios de proteína ACBP

A descrição do genoma do *T. castaneum* elucidou a identificação precisa de 6 genes diferentes, constatado por análise de domínios conservados (**Figura 15**) e verificado por alinhamento entre elas (**Figura 13**), comprovando a sua codificação para proteínas de domínio ACBP. A **Figura 13** representa um fragmento de regiões conservadas do alinhamento das TcACBPs.

Figura 13- Fragmento do alinhamento das sequências das *TcACBP*s através do programa Clustal ômega. São mostrados apenas os fragmentos onde há domínios conservados característicos da ACBP. As marcações indicam identidade (*), alta similaridade (;) e baixa similaridade (.).

TcACBP2	-----MAAESDSSQLLENFSKLEVKTA	22
TcACBP3	SEETPKLECNFCFDEGWGSTENQLISIIHSPVIHRVLAAPSEVRENTELWTEMSF---	597
TcACBP4	-----MTTEEF---	7
TcACBP5	-----MATSLDSFNDLKE---	13
TcACBP1	-----	0
TcACBP6	-----	0
TcACBP2	KRKSSVNNASNDTLEYGLPLTEVYKLAFSFYKEKEGK--AVHFSYEDKLQLVAFSQQVLH	80
TcACBP3	-----RN--FISPMRLVDGQDYRFYEEKLKESSYQPSNDLMLRFYAYYKQATL	644
TcACBP4	-----NA--AV-----NVIKSLPKNGSYQPSNDLMLRFYAYYKQATL	42
TcACBP5	-----LGIDCEDSDSLT--DAFNKAANHLPN-LLPNVDNHTLLSLYGYKQGSQ	59
TcACBP1	-----MSLD--EKFKSACDQIRQ-FTKRPSDSMDLEVYSLYKQATV	38
TcACBP6	-----MSLD--ERFKKAADDVQK-LKSKPSNDDLLEIYALFKQGSV	38
	: . . * . . :*	
TcACBP2	GPLSEAINKLPLGLTLDVVGKDRRLAWQKLGKLSLTDQARAGFVELLSRRCPFLFSAYVEAH	140
TcACBP3	GPCT-----GRRPAFYDVVGRACYDAWKS LGEMSKSTAMAKYVDELHTIVETMSYSDKVA	699
TcACBP4	GPCT-----GRRPAFYDVVGRACYDAWKS LGEMSKSTAMAKYVDELHTIVETMSYSDKVA	97
TcACBP5	GPCN-----TPKPSWFDMAKSKWEAWSKLGDMQNKAKQIYIETIKLDPFNVPEKES	114
TcACBP1	GDIN-----TPKPS--EAKAKAKWEAWSGKGLNANVAKEQYVAKIKALAPTYA-----	85
TcACBP6	GDCN-----TDRPGMLDLKGKAKWDANGKKGMSQDKAKEEYIAKVESLIQSIGLQ----	89
	* . . . : . : ** . : . * : : :	
TcACBP2	RREKKEQERKAKEEEKRRLI-EEEEKQKKEEAKLIQEQLTKEEAIKRQIQALNEQTFD	199
TcACBP3	NFL----EAPTNEIECVNMIMDDLELVA----GDVL-EK-----VRSQPNSPASREAS	744
TcACBP4	NFL----EAPTNEIECVNMIMDDLELVA----GDVL-EK-----VRSQPNSPASREAS	142
TcACBP5	WVS----VSPQNLEGFKEA---KEKTV---ADFV-----KEENYLEVA-----	148
TcACBP1	-----	85
TcACBP6	-----	89

Dentre as sequências identificadas, a *TcACBP6* foi analisada por alinhamento com outras ACBPs de vários organismos (**Figura 14**). Por essa análise, observamos regiões bastante conservadas, incluindo os resíduos importantes para a ligação do acil-CoA (KRAGELUND et al., 1993) que se encontram marcados nas regiões de identidade (*) e alta similaridade (;).

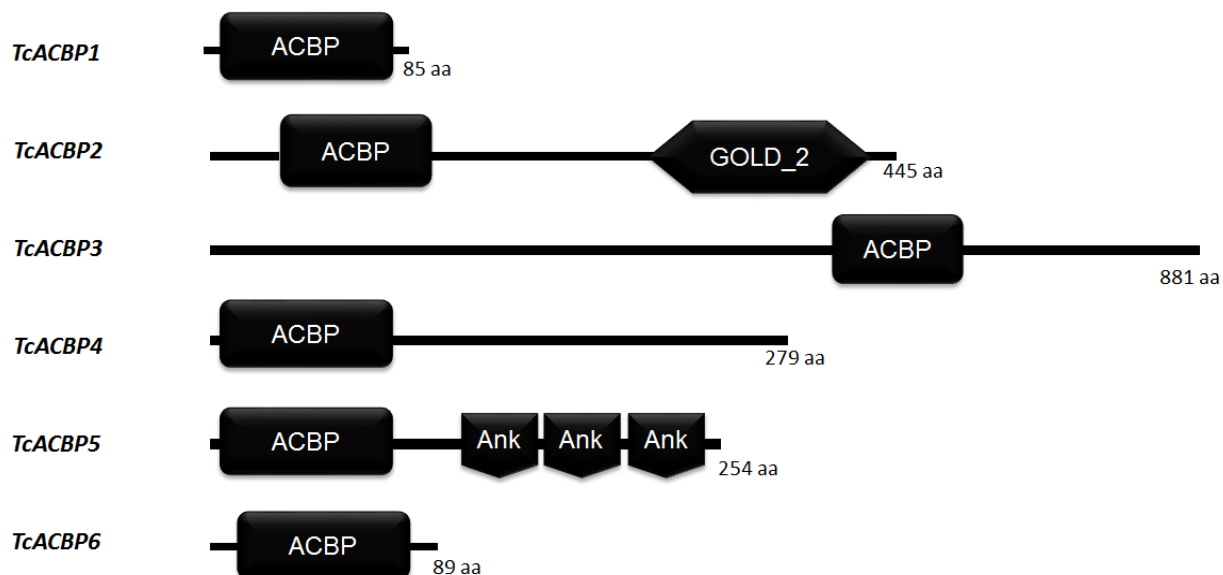
Figura 14- Alinhamento das sequências de aminoácidos da TcACBP6 com ACBPs de diferentes espécies através do programa Clustal ômega. As marcações indicam identidade (*), alta similaridade (:) e baixa similaridade (.)

ScACBP1	-----MVSQLFEEKAKAVNELPTKPSTDELLELYALYKQATVGDNDKE	43
DmDBI	-----MVSEQFNAAAEKVKSLTKRPSDEFLQLYALFKQASVGDNDTA	43
HsACBD1	MWGDLWLLPPASANPGTGTEAEFEKAAEEVRHLKTKPSDEMLFIYGHYKQATVGDINTE	60
TcACBP6	-----MSLDERFKKAADDVQKLSKPSNDLLEIYALFKQGSVGCNTD	44
RpACBP-1	-----MTEEGFLKAVEDVKNLEKTPTEELLEIYALYKQATTGDCNTS	43
	. * .. * . * : : : * : * . : * . : * * . : * * . : .	
ScACBP1	KPGIFNMKDRYKWEAWENLKGKSQEDAEKEYIALVDQLIAKYSS--	87
DmDBI	KPGLLDLKGKAKWEAWNKQKGSSEAAQQEYITFVEGLVAKYA---	86
HsACBD1	RPGMLDFTGKAKWDAWNEKGTSKEDAMKAYINKVEELKKKYGI--	104
TcACBP6	RPGMLDLKGKAKWDAWNGKKGMSQDKAKEEYIAKVESLIQSIGLQ-	89
RpACBP-1	KPGMFDKFKKAKWEAWNGKKGVSQSEAKESYVEKVKSLIASYGLKL	89
	: * : : : : : : * * : * : * * * . . * : * : * . * . . .	

A estrutura proteica dessa família não funciona apenas a partir de um domínio único, a arquitetura do domínio ACBP também é encontrada em um total de 48 diferentes estruturas proteicas de comprimento variável, abrangendo todas as espécies eucariotas e alguns procariontes (NEESS et al., 2015).

No *T. castaneum* encontram-se 4 sequências com o único domínio ACBP, de ligação tiol ésteres de ácidos graxos longos e coenzima A, com modo de ligação “um-para-um” com alta especificidade e afinidade. Duas delas, a TcACBP1 e 6, são bem semelhantes com aproximadamente 10 kDa cada uma. A TcACBP4, um pouco maior com 31 kDa e a TcACBP3 sendo a maior com 101 kDa. As demais além do domínio ACBP, apresentam também domínios de anquirina C-terminais (3 cópias) visto em TcACBP5, semelhante em proteínas de plantas, animais e protozoários (MARCHLER-BAUER, 2015, 2017; SHENNAN, 2020). Os domínios proteicos das sequências de TcACBP estão resumidos na **Figura 15**.

Figura 15- Resumo comparativo dos domínios nas sequências de TcACBP. Ilustração dos domínios de proteína identificados de acordo com pesquisa no CD-search. Domínios: de ligação de acil-CoA (ACBP); ankyrin (Ank); dinâmica do Golgi (OURO). Tamanho das sequências em resíduos de aminoácidos (aa).



O domínio anquirina é relatado na espécie *A. thaliana*, como envolvido na interação com um fator de transcrição que responde aos níveis de etileno na planta (LI; CHYE, 2003). Em *D. melanogaster*, os autores sugeriram que esta ACBP poderia regular a expressão gênica interagindo com o fator de transcrição FoxO, superfamília de fatores de transcrição responsáveis pela modulação de genes envolvidos em inúmeras funções celulares (diferenciação, proliferação e sobrevivência celular) (RYUDA et al., 2011). Em *R. prolixus*, uma proteína semelhante foi identificada, a RpACBP-2 com domínios de anquirina C-terminais (MAJEROWICZ et al., 2016). Este motivo, direciona interações proteína-proteína dependendo do tipo de repetição anquirina, que pode estar associado ao tráfico intracelular e endocitose (MOSAVI et al., 2004; SINGARAJA et al., 2002). Poucos estudos elucidam a resposta das repetições anquirina, no entanto essas repetições são um dos mais populares desta classe e foram encontrados em um número de proteínas biologicamente interessantes (MOSAVI et al., 2004). As repetições de anquirina em ACBP de *Cryptosporidium parvum* são responsáveis por ancorar estas proteínas à membrana, interagindo com uma proteína de ligação ao elemento responsiva ao etileno. Ela também é uma proteína de membrana e sua interação é provavelmente mediada pela interação da repetição

anquirina com uma proteína desconhecida no vacúolos de membranas parasitóforos (ZENG; CAI; ZHU, 2006).

A TcACBP2 apresenta estimativa de massa molecular em 51 kDa, com o domínio de interação com o Complexo de Golgi (Golgi Dynamics, GOLD) C-terminal. O Domínio do tráfico de Golgi é sempre encontrado combinado com domínios de associação lipídica ou de membrana. Em mamíferos, esta proteína está envolvida na esteroidogênese, apoptose, embriogênese e neurogênese (FAN et al., 2010). O domínio GOLD coexiste com outros domínios globulares conservados, no entanto essa ACBP está associada a uma família de função desconhecida (DUF5401) encontrada em *Chromadorea*.

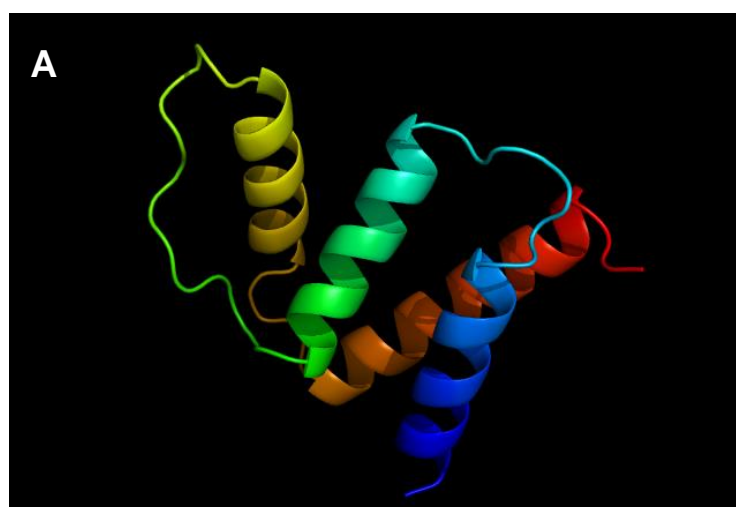
A maior sequência de ACBP no *T. castaneum*, TcACBP3, coexiste com a família do complexo HAUS-augmin (pfam14817), que contribui para a montagem do fuso mitótico, manutenção da integridade dos cromossomos e conclusão da citocinese; *Phage shock protein B* (PspB), que consiste numa família de várias sequências bacterianas da PspB, induzido em resposta ao calor, etanol, choque osmótico e infecção por bacteriófagos filamentosos; e a endonuclease associada a CRISPR Cas9, incluindo os domínios REC1 e REC2, que ocorre naturalmente em bactérias como uma defesa contra a invasão por fagos ou outros elementos genéticos móveis.

5.2.3 Predição de estrutura tridimensional

A predição da estrutura terciária da proteína selecionada (TcACBP6) apresentou-se muito conservada, e no formato de quatro α -hélices, como já descritos para outras ACBPs (KRAGELUND et al., 1993; TASKINEN et al., 2007; VAN AALTEN et al., 2001), mostrado na **Figura 16**.

A predição da estrutura apresentou semelhança estrutural mais próxima à sequência alvo, isto é, o maior escore de TM (C-score=0.88) da análise sugerida. Os aminoácidos importantes para a ligação à molécula de acil-CoA, identificados previamente por KRAGELUND (1993, 1999) para a ACBP bovina, mostraram-se próximos na estrutura tridimensional dessa proteína e parecem formar um “domínio de ligação”.

Figura 16- Estrutura tridimensional predita para a TcACBP-6 através do programa de predição I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) e visualizada com o programa PyMOL (software v. 2.0+). (A) Estrutura tridimensional da TcACBP-6 mostrando as quatro α -hélices preditas. (B) Apresentação da sequência de aminoácidos e em destaque, os aminoácidos importantes para ligação à molécula de acil-CoA. (C) Estrutura tridimensional predita em azul e em laranja o sítio de ligação para acil-CoA, assim como predito inicialmente para proteína de domínio ACBP (KRAGELUND et al., 1993, 1999). (D) Estrutura de átomos cheios mostrando as hélices em azul e os aminoácidos essenciais para a ligação em laranja.

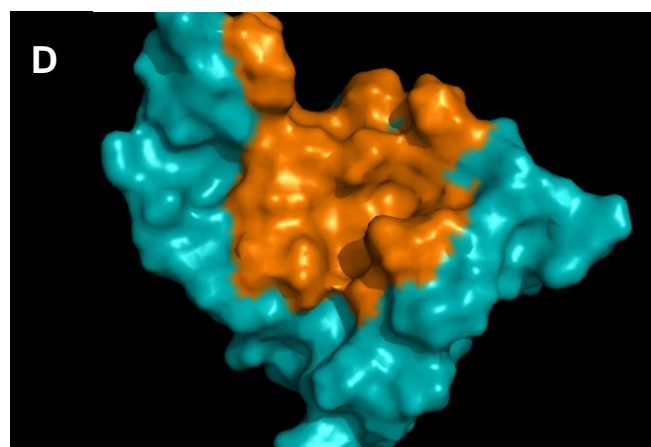
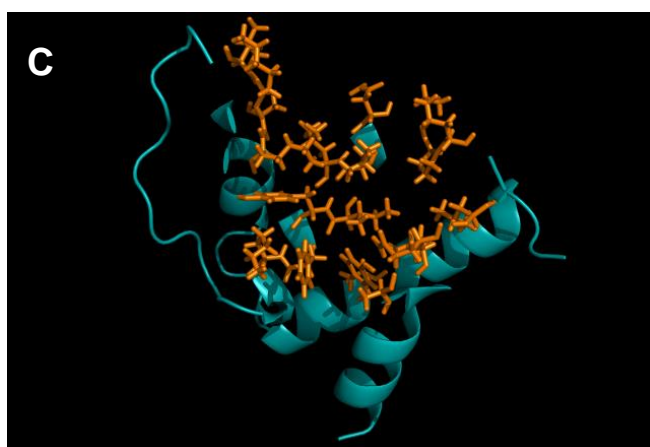


B

>TcACBP-6

```

1  MSLDERFKKAADDVQKLKSKPSNDDLLEIYALFKQGSVGCNTDR  45
46 PGMLDLKGKAAKWDANGKKGMSQDKAKEEYIAKVESLIQSIGLQ  89
  
```



Analisando as informações do Protein Data Bank (PDB) sobre a forma 3D de TcACBP6, verificamos proteínas estruturalmente próximas, como por exemplo, a L-ACBP ligante de humanos (2cb8A, TM score= 0,94), o domínio de ligação da acil-coenzima A humana contendo 5 (3flvA, TM score= 0,92) e proteína de ligação acil-CoA 2 de *Oryza sativa* (arroz japônica) (5h3iA, TM score= 0,9). As demais relações de PDB são listadas na **Tabela 7**.

Tabela 7- Relação das proteínas estruturalmente próximas à TcACBP6 pelo banco de dados do Protein Data Bank (PDB).

PDB	TM-score ^(a)	IDEN ^(b)	Cov ^(c)
2cb8A	0.943	0.535	0.966
3flvA	0.922	0.307	0.989
5h3iA	0.903	0.386	0.989
3fp5A	0.899	0.393	0.989
5h3gA	0.889	0.393	1.000
2wh5A	0.861	0.326	0.944
1hbkA	0.859	0.186	0.955
2cquA	0.858	0.379	0.955
5ijmA	0.854	0.330	0.978
2copA	0.830	0.425	0.966

(a): classificação de proteínas é baseada no alinhamento estrutural entre a estrutura de consulta e estruturas conhecidas na biblioteca do PDB.

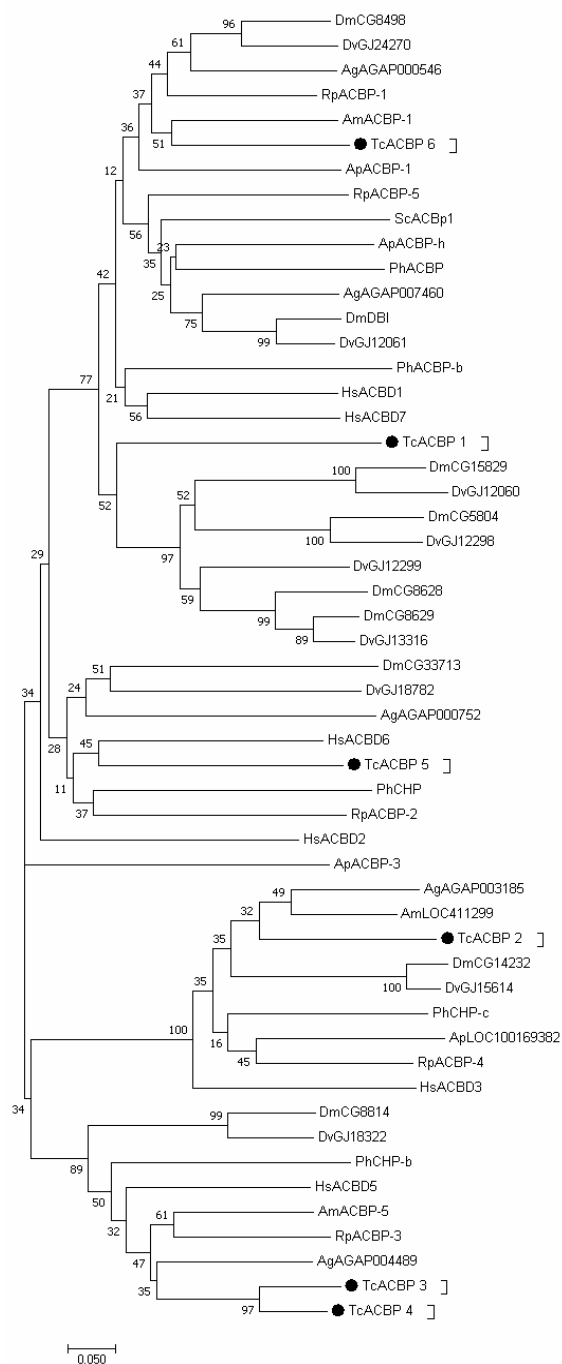
(b): identidade percentual da sequência na região estruturalmente alinhada

(c): cobertura do alinhamento por alinhamento de TM e é igual ao número de resíduos estruturalmente alinhados dividido pelo comprimento da proteína de consulta

5.2.4 Análise de homologia por árvore filogenética

A partir das sequências de todas as ACBPs detectadas no genoma do *T. castaneum*, foi possível representar o processo evolutivo dessa família de proteínas no grupo dos insetos, e incluindo *Homo sapiens*, através de uma árvore filogenética (**Figura 17**).

Figura 17- Relação evolutiva da família de genes ACBP na Classe Insecta. A árvore filogenética foi inferida pelo método de “*neighbour-joining*” (p-distance) (SAITOU; NEI, 1987). As distâncias evolutivas foram calculadas pelo método da distância p com bootstrap de 1000 réplicas (NEI; KUMAR, 2000) e execução no programa MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). São mostrados próximos aos ramos os valores de bootstrap. O organismos adicionados são: *Anopheles gambiae* (Ag); *Apis melífera* (Am); *Acyrtosiphon pisum* (Ap); *Drosophila melanogaster* (Dm); *Danaus plexippus* (Dp); *Drosophila virilis* (Dv); *Pediculus humanus* (Ph); *Rhodnius prolixus* (Rp); *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). Inclui a espécie *Homo sapiens* (Hs).



A árvore filogenética foi analisada a fim de obter uma relação evolutiva dessa família de genes codificantes para ACBP dentro da classe de insetos, e com isso, avaliar sobre o nível de semelhança e afiliação da ACBP nos insetos e sua relação no *H. sapiens*. Isso é importante para entender a similaridade ou divergência em função das proteínas com base em sua estrutura, mas também pode fornecer uma pista sobre a função da ACBP em espécies que ainda não foram definidas. Portanto, a árvore filogenética foi construída a partir de testes no método *neighbour-joining* e também, comparações pelo *Maximum Likelihood* com base no método *Equal Input mode*.

A análise filogenética molecular pelo método da máxima verossimilhança foi baseado em alguns estudos (BURTON et al., 2005; MAJEROWICZ et al., 2016, 2017; RABOANATAHIRY et al., 2018, 2015), e apresentou perfil de história evolutiva semelhante ao método *neighbour-joining*, que apresentou melhor bootstrapping.

Em todas as análises, observamos forte semelhança evolutiva nas TcACBPs 3 e 4 e aproximação destas com HsACBD5 de humano. As demais TcACBPs se apresentaram em clados distintos. E analisando a TcACBP6, observou-se semelhança com AmACBP1 de *Apis melífera*, com apresentação delas em mesmo clado.

Como visto na **Figura 17**, as ACBPs são altamente conservadas durante a evolução, causando pequenas distâncias evolutivas aparentes entre os ramos da árvore filogenética.

5.3 Caracterização da expressão gênica de TcACBP6 por RT-qPCR em tecidos e estágios de desenvolvimento

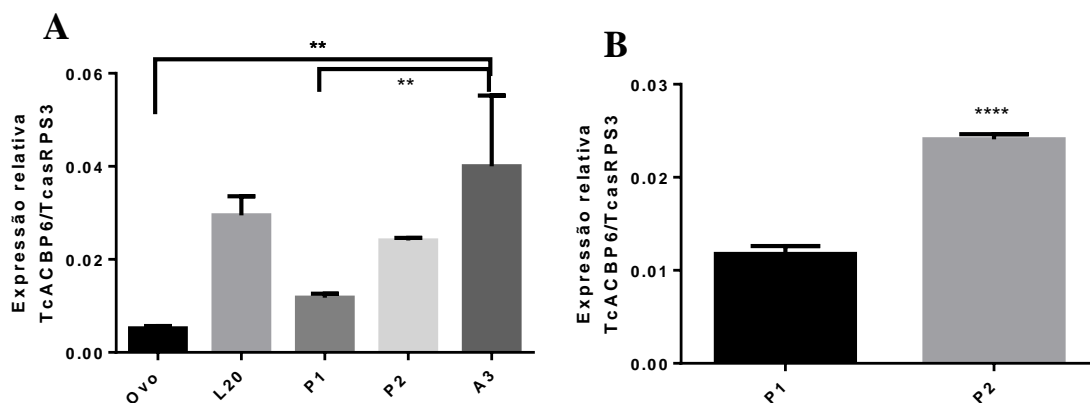
A expressão gênica para ACBP no *T. castaneum* foi inicialmente caracterizada para um dos genes identificado neste inseto, o TcACBP6, o qual foi avaliado ao longo das fases do ciclo de vida. Por ser um inseto de metamorfose completa, foram determinadas as fases específicas para melhor analisar, que foram: Larvas com 20 dias (L20), pupas recém-formadas (P1), Pupas no fim do estágio (P2) e Adulto com 3 dias (A3) (**Figura 18**).

Através de análise por RT-qPCR ficou evidenciada a expressão relativa da *TcACBP6* em todos os estágios de desenvolvimento. Todavia, a expressão foi melhor visualizada na fase de A3, L20 e P2, considerando significância estatística para A3 em relação a P2 e ovo (**Figura 18 A**). Percebe-se que essa ACBP pode estar associada a demandas básicas na célula e por isso se mantém expressa nas diferentes condições do ciclo de vida, com exceção da fase de ovo. Contudo observamos a expressão do gene em 3 condições distintas da metamorfose do inseto, na larva, pupa e adulto.

Considerando estas condições, é relevante notar o aumento da expressão entre o início e o final da fase de pupa que reflete a metamorfose para a fase adulta (**Figura 18 B**). No momento de mudança de fase é crucial a alta demanda energética, e na fase de pupa boa parte da reserva é mobilizada para as transformações morfológicas necessárias para chegar a fase adulta (ZIEGLER, 1991). Observa-se então a possibilidade de participação da *TcACBP6* na mudança de fase caracterizada por ter sua expressão aumentada durante a fase de pupa (P1 – P2). Assim como sua vinculação aos processos de mobilização energética e preparo para muda também visualizados em L20 (**Figura 18**).

A expressão significativa observada no adulto não vincula à mudança de fase e sim a necessidade de expressar essa ACBP para processos bioquímicos básicos como a manutenção energética basal e em condições de alta demanda como voo, e ovogênese no caso da fêmea.

Figura 18- Expressão relativa do gene *TcACBP6*. Expresso em todas as fases de desenvolvimento do *T. castaneum* (A) e aumento da expressão durante a evolução da fase de pupa (B). Ovo; larva 20 dias (L20); recém pupa (P1); pupa final (P2); adulto 3 dias (A3). Os valores mostrados são a média e SD; * $p < 0.0001$, $n \geq 4$ (Student's t test e ANOVA).

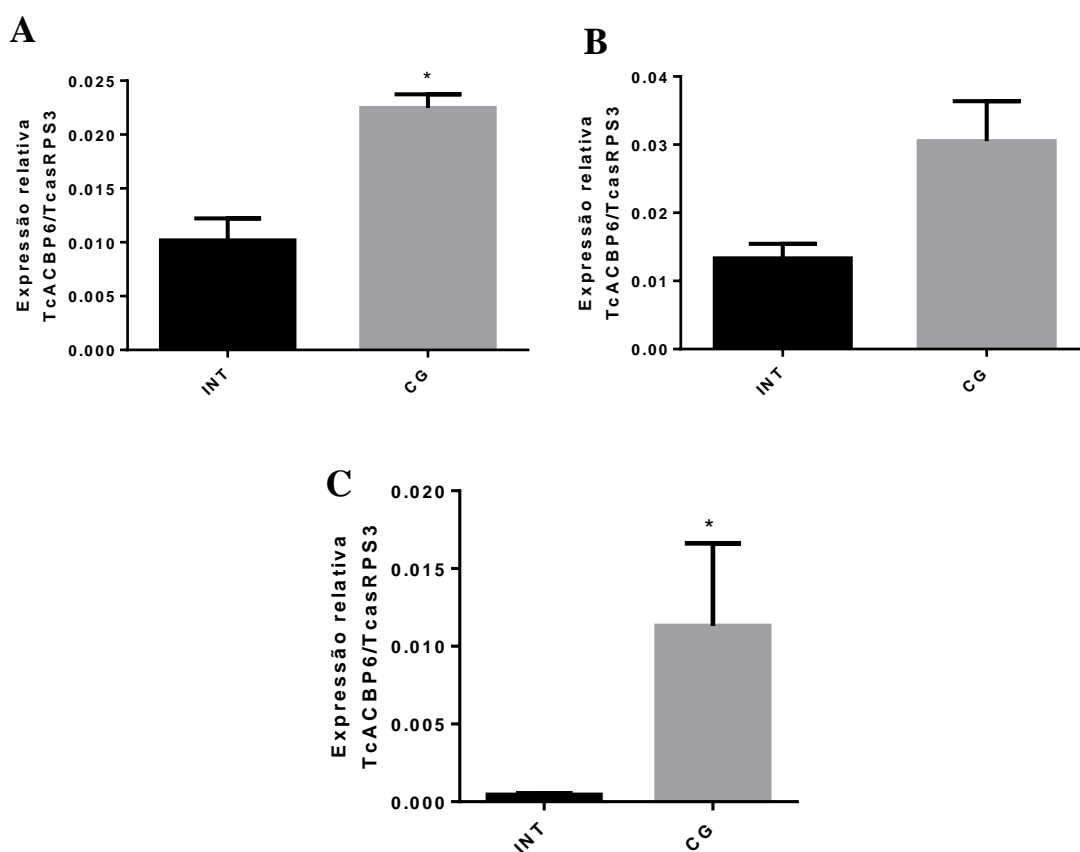


Avaliando melhor a expressão de *TcACBP6* em L20, podemos observar que na fase larval de insetos é relatado um aumento maciço de massa corporal desde a sua eclosão, que equivale praticamente ao ganho de reservas no corpo gorduroso, as quais são mobilizadas para fornecer energia para a muda, por isso nas larvas a alimentação contínua para acumulação de reservas e a mobilização destas parecem ser importantes, e por isso, regulada finamente por hormônios (ZIEGLER, 1991).

No processo de evolução larva-adulto, ocorre remodelação do corpo gorduroso durante os estágios iniciais da metamorfose larval como medida de preparo, com isso, as células de gordura estocadas no final da fase de larva além de servir como importante estocagem nutricional para formação do adulto, ainda serve para a manutenção nos 3 primeiros dias após sua eclosão (ZHENG; YANG; XI, 2016). Como esse processo é desencadeado por hormônios e de forma autônoma celular, estudos em *Drosophila* mostraram que receptores do fator de crescimento estimulam a remodelação prematura do corpo gorduroso por sinalização do hormônio ecdisona (20E) o qual induz a dissociação de células adiposas e formação da pupa (NELLIOT; BOND; HOSHIZAKI, 2006). Desse modo, a maior expressão relativa para *TcACBP6* nas larvas e pupas de *T. castaneum* deve estar associada ao constante fluxo de ácidos graxos que ocorre nessas fases.

Para compreender melhor a expressão de TcACBP6 nas fases de larva e pupa, foi analisada a expressão nos tecidos. A expressão da ACBP em geral, mostrada nas evidências científicas é mais comumente observada em intestino, corpo gorduroso e ovário (ALVES-BEZERRA et al., 2010b; KOLMER et al., 1994; LIU; ZHANG; XU, 2005; MATSUMOTO et al., 2015; SIEGLAFF; DUNCAN; BROWN, 2005; SNYDER; ANTWERPEN, 1997). Observando a expressão desse gene no corpo gorduroso (CG) e intestino (INT) do *T. castaneum*, os dados mostraram expressão mais significativa no CG, tanto na fase de larva (L20) quanto nas fases de pupa (P1 e P2), mostrados na **Figura 19**.

Figura 19- Expressão relativa do gene *TcACBP6* nos tecidos do corpo gorduroso (CG) e intestino (INT) na fase (A) recém pupa (P1); (B) pupa final (P2) e de (C) larva 20 dias (L20). Os valores mostrados são a média e SD; * $p < 0.0006$ (C); * $p < 0.005$ (A/B), $n \geq 2$ (Student's t test e ANOVA)



Para entender a expressão relativa visualizada no intestino, temos que a transcrição da ACBP é regulada durante os períodos de maior transporte de lipídeos e sincronizado com a alimentação (ALVES-BEZERRA et al., 2010b;

GONDIM et al., 2018; GRILLO; PONTES; GONDIM, 2003). O que se esperaria na fase L20, mas é menor quando comparada com a expressão no intestino das fases de pupa (**Figura 19**).

No entanto, esse perfil é bem observado em insetos que tem um período específico de alimentação, como nos hematófagos. Entretanto, o *T. castaneum* mantém um período constante de alimentação, especialmente na fase adulta e mais intenso na larva, com um período de não alimentação na fase de pupa. Então nesse sentido, espera-se que no *T. castaneum* a expressão da ACBP seja constante no intestino, no entanto isso foi observado melhor na fase de pupa, o que parece ser estranho pois não há alimentação nessa fase, mas que pode ser justificado pelo provável acúmulo residual de lipídeos não absorvidos no intestino médio no período de larva e por isso ainda estão presentes na pupa. Esse efeito foi melhor identificado em larvas de *Drosophila* HNF4 (mutantes nulas de receptores nucleares que inclui dois receptores de mamíferos, HNF α e HNF γ), que retêm lipídios no intestino médio e no corpo gorduroso pelo efeito na expressão reduzida de genes que controlam o catabolismo lipídico e a β -oxidação (PALANKER et al., 2010).

Porém a expressão no corpo gorduroso foi significativa em P1 e L20. Portanto, considerando que há probabilidade que a larva com 20 dias esteja estocando mais (ZIEGLER, 1991), fica evidenciado que a expressão de TcACBP6 no CG (**Figura 19C**) esteja associado a via de estocagem lipídica, assim como ainda no início da fase de pupa, visto em P1 (**Figura 19A**), e ao mesmo tempo mobilizando os estoques do CG em P2 para mudança de fase (**Figura 18B**).

Para entender melhor o que acontece em P1, podemos correlacionar esse dado com o que foi observado no gênero *Aedes* e em *Anopheles stephensis* (SAWABE; MORIBAYASHI, 2019; ZIEGLER; IBRAHIM, 2001), mosquitos anautógenos (que iniciam a vitelogênese após uma refeição de sangue), onde as fêmeas alimentadas com açúcar também acumulam reservas de TAG no corpo gorduroso após a emergência da pupa, o que permite correlacionar com o aumento da expressão no corpo gorduroso mais significativo em P1.

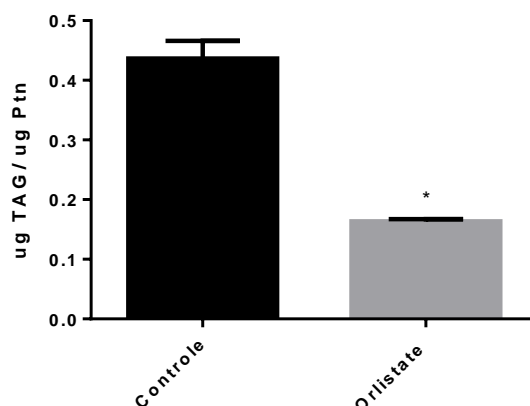
Até o momento sugerimos a hipótese do *TcACBP6* estar envolvido na síntese e mobilização de ácidos graxos no CG. Portanto, foram seguidas análises de expressão desse gene em condições alimentares distintas. Primeiramente sob inibição de lipase pancreática levando a redução de absorção lipídica e em seguida numa condição inversa, sob ingestão hiperlipídica.

5.4 Expressão gênica de *TcACBP6* em larvas condicionadas à um inibidor de lipase pancreática, tetraidrolipstatina (Orlistate®), avaliação dos índices nutricionais, TAG e expressão de genes relacionados

A avaliação da expressão gênica da *TcACBP6* na presença do inibidor de lipase pancreática foi feita após a incorporação da tetraidrolipstatina na alimentação das larvas com 15 dias e comparado com o grupo controle, não tratado (apenas em dieta base), após 4 dias de tratamento. O efeito desse inibidor de lipase pancreática foi verificado nos índices nutricionais e dosagem de TAG. Após confirmação do efeito metabólico esperado pela redução de absorção lipídica, a expressão gênica de *TcACBP6* e de genes relacionados foi analisada.

Após 96h de tratamento, os níveis de TAG foram medidos nos homogenatos das larvas inteiras (normalizado por mg de proteína do extrato). Os dados mostraram redução significativa na concentração de TAG nas larvas tratadas com tetraidrolipstatina quando comparadas ao controle (**Figura 20**).

Figura 20- Níveis de triacilglicerol em larvas tratadas com tetraidrolipstatina (Orlistate®) após 96h em comparação ao controle. Os valores mostrados são a média e SD; * $p < 0.005$, $n \geq 4$ (Student's t test).

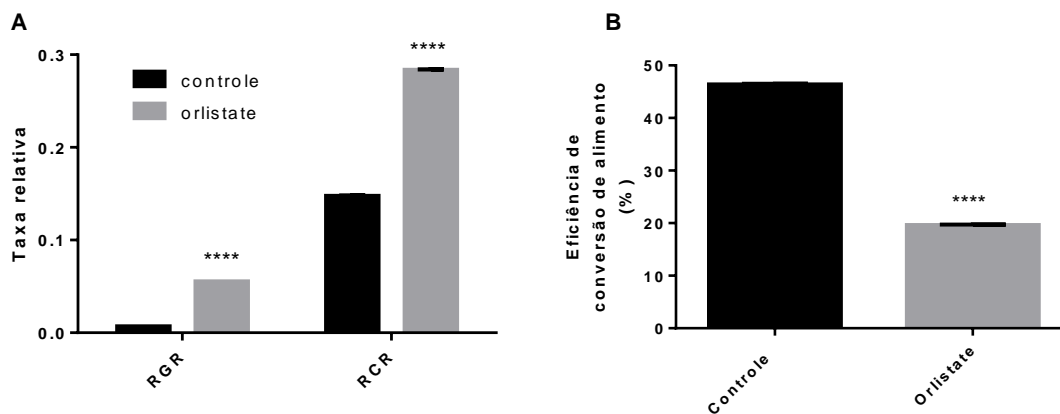


No estágio larval, a maior concentração lipídica será obtida através da alimentação e nesse estágio há constante estocagem de reserva no corpo gorduroso (ZIEGLER, 1991). Portanto, a redução de TAG evidenciada no conteúdo total da larva mostrou o efeito previsto pela redução da absorção lipídica no intestino por ação do inibidor de lipase pancreática.

A ação desse inibidor também foi determinada avaliando ao longo das 96h, os índices nutricionais, peso e mortalidade. Na análise dos índices nutricionais, foram calculados a Taxa de Consumo Relativo (RCR, *Relative Consumption Rate*), Taxa de Crescimento Relativo (RGR, *Relative Growth Rate*) e Eficiência de Conversão do Alimento (ECI, *Food Conversion Efficiency*).

Na **Figura 21A**, evidencia-se aumento significativo da RGR e RCR no grupo tratado comparado ao controle, mostrando que houve aumento da ingestão de alimento pelas larvas que tinham a tetraidrolipstatina em sua alimentação. Uma taxa maior de consumo no grupo tratado pode estar relacionada com a necessidade de compensar a redução da absorção de lipídeos da dieta causada pela ação da tetraidrolipstatina, esse fato pode ser justificado pela ECI reduzida no grupo tratado em 19,58% (**Figura 21B**).

Figura 21- Índices nutricionais da larva do *T. castaneum* após 96h de tratamento com tetraidrolipstatina (Orlistate®). (A) Aumento na RGR = Taxa de crescimento relativo e RCR = taxa de consumo relativo; e (B) redução na ECI = eficiência da conversão de alimento ingerido. Para análise estatística foi aplicado (A) 2way ANOVA e Student's t test não pareado, média e SD; * $p < 0.0001$, $n \geq 3$ e (B) Student's t test não pareado, média e SD; * $p < 0.0001$, $n \geq 3$.



Esses dados comprovam que há uma necessidade de ingestão lipídica pelas larvas nesse inseto observado na tentativa de manter a ingestão desse alimento (**Figura 21**), assim como se estabelece uma condição energética limitada pela ação do inibidor de lipase pancreática observado na **Figura 20**.

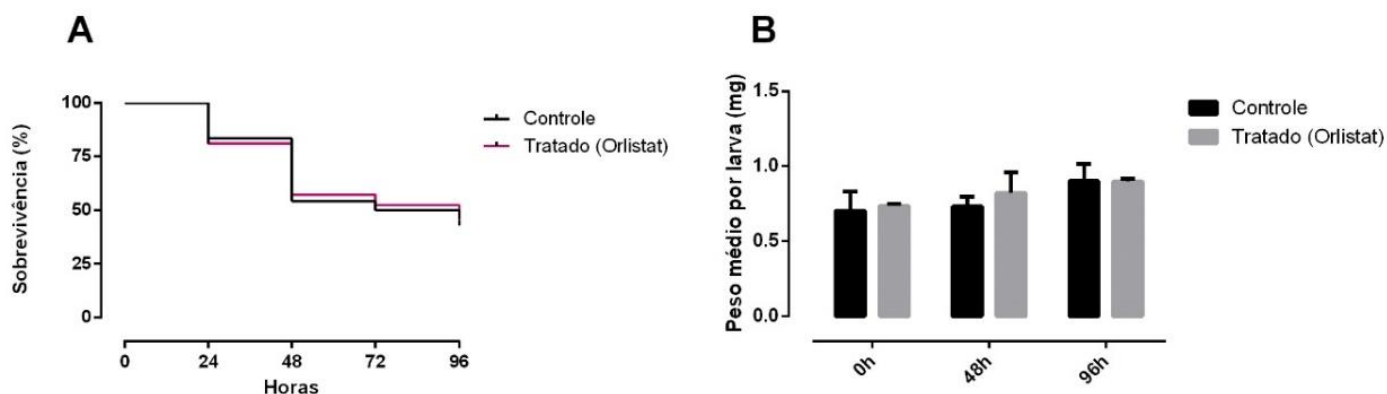
Apesar desse efeito, não houve diferença significativa nas taxas de sobrevivência entre os grupos controle e tratado, variando ambos em torno de 60% de mortalidade nos grupos observado entre 15 e 20 dias, aparentemente demonstrando que o uso de um inibidor de lipase não provocou mortalidade significativa (**Figura 22A**), ou seja, mesmo com o menor aporte de lipídeos vindos da dieta, os insetos conseguiram manter a sobrevivência em taxas normais o que corrobora com os dados de RCR e RGR.

Da mesma forma, foi observada a relação quanto a variação de peso, onde não foram observadas diferenças significativas no peso médio das larvas ao longo do tratamento com tetraidrolipstatina em comparação ao grupo controle (**Figura 22B**), o que nos possibilita sugerir que a ação da tetraidrolipstatina pode ter causado uma alteração metabólica apenas pelo déficit lipídico e seus efeitos ocorrem na tentativa de manutenção de uma homeostase lipídica.

Muitos estudos em animais têm esclarecido a relação entre os estoques de lipídeos e longevidade (MOTA; FIGUEIREDO; DUARTE, 2004; PAULA,

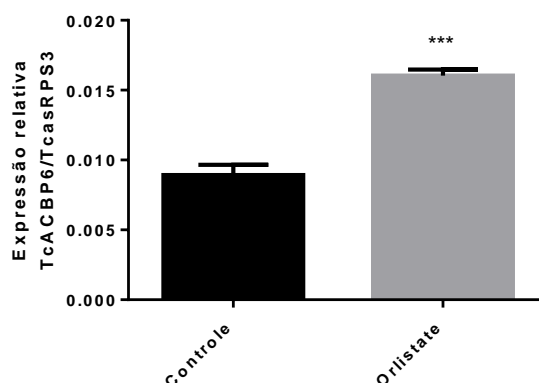
2017). Em *D. melanogaster*, o acúmulo de reservas lipídicas encurtou a vida útil destas moscas, no entanto, a indução dos genes componentes da via de β -oxidação esteve relacionado com o aumento da longevidade dos insetos por aumentar a tolerância às condições de stress (PAULA, 2017).

Figura 22- Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier (A); Peso médio de larvas tratadas com tetraidrolipstatina (Orlistat®) (0,1mg/mg de farinha) frente ao grupo controle (B). As barras representam média \pm erro padrão de 3 determinações. A análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA duas vias.



Diante destes dados, os mesmos grupos tratados foram utilizados para avaliar o efeito quanto à expressão do gene para *TcACBP6* por PCR em tempo real. Na **Figura 23**, é observado o aumento significativo da expressão gênica da *TcACBP6* sob a condição de baixa ingestão lipídica e consequente déficit calórico avaliado na larva inteira após o tratamento com tetraidrolipstatina durante 96 horas.

Figura 23- Expressão relativa de TcACBP6 nas larvas tratadas com tetraidrolipstatina (Orlistate®) após 96h. Os valores mostrados são a média e SD; * $p < 0.0001$, $n \geq 2$ (Student's t test).



A tetraidrolipstatina é um medicamento aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento da obesidade por agir inibindo as lipases pancreáticas e com isso reduzir a absorção da gordura da dieta e por consequência aumentar sua excreção nas fezes. Porém a nível molecular, a tetraidrolipstatina inibe a tioesterase da enzima ácido graxo sintase de humanos, a qual está envolvida na síntese *de novo* de ácidos graxos, e com isso, a redução da biossíntese de lipídeos induz a ativação da hidrólise de triacilgliceróis estocados no tecido adiposo (FAKO; ZHANG; LIU, 2014).

Nos insetos, essas enzimas da ácido graxo sintase já foram identificadas como um complexo enzimático que utiliza malonil-CoA para adicionar sequencialmente unidades de dois carbonos a uma molécula iniciadora de acetil-CoA para produzir o ácido graxo (GONDIM et al., 2018). Essa síntese *de novo* já foi identificada em corpo gorduroso de insetos como em *M. sexta* e *B. mori* a partir do acetato incorporado que é metabolizado em TAG (ARRESE et al., 2001), assim como no grilo *G. bimaculatus*, onde a síntese de lipídeos, também acontece a partir de acetato e é mediado pela atividade da enzima da ácido graxo sintase, a qual pode variar durante o desenvolvimento do inseto (LORENZ; ANAND, 2004).

Então além da captação de ácidos graxos da dieta estar reduzida nas larvas alimentadas com tetraidrolipstatina, esse fato propõe que a via de síntese endógena também pode estar comprometida e por isso cogitar um deslocamento energético para ativação da hidrólise de triacilglicerol no corpo gorduroso para

manutenção da homeostase lipídica, a fim de fornecer ácidos graxos como substrato para a β -oxidação nos tecidos com alta demanda energética.

Assim, sabendo-se que os ésteres de acil-coA são intermediários chave em diversas vias metabólicas lipídicas (FAERGEMAN; KNUDSEN, 1997), a expressão aumentada de *TcACBP6* pode ocorrer pela necessidade de direcionamento dos ésteres de acil-coA para β oxidação, pois é sugestivo que o transporte de ácidos graxos para fora dos adipócitos com destino à β -oxidação é ativado nessas condições, da mesma forma como baseado em *D. melanogaster*, quando a β -oxidação de ácidos graxos ativa a lipólise no corpo gorduroso (KISHITA et al., 2012).

Uma analogia pode ser feita analisando a redução no conteúdo de TAG hepático que está associada ao aumento da β -oxidação. Essa observação foi feita em camundongos através do bloqueio da ação da GPAT1 (glicerol-3-fosfato aciltransferase), isoforma que corresponde a 30-50% da atividade total dessa enzima no fígado e responsável pela síntese de TAG, esse bloqueio reduziu o peso corporal pela redução do conteúdo de TAG formado e aumento da β -oxidação hepática (WENDEL et al., 2013).

Esse efeito é também observado em insetos, no intestino médio e no corpo gorduroso de *R. prolixus*, assim como no intestino médio de *P. megistus*, onde a via G3P foi detectada (ALVES-BEZERRA; GONDIM, 2012; CANAVOSO; FREDE; RUBIOLLO, 2004). Em *R. prolixus* o bloqueio de RhoprGpat1 resultou em redução de 50% e 65% no conteúdo de TAG no intestino posterior e no corpo gorduroso, respectivamente, que levou a um aumento de 2 vezes nas taxas de β -oxidação de ácidos graxos no corpo gordo, órgão que se assemelha ao fígado nos mamíferos (ALVES-BEZERRA et al., 2017).

Então a redução de TAG observada no *T. castaneum* (**Figura 20**) pelo efeito da tetraidrolipstatina, seja pela redução da absorção de lipídeos da dieta ou pela inibição da ácidos graxo sintase, aparentemente pode estar associada a um estímulo para β -oxidação impulsionando vias endógenas de mobilização de ácidos graxos e que pode inferir sobre a expressão aumentada para *TcACBP6*, provavelmente atuando nessa via.

Esse fato se complementa com o efeito reduzido da eficiência de conversão de alimento ingerido, exigindo maior necessidade de lipólise. Essa

hipótese ainda é sustentada analisando a necessidade de manutenção das taxas metabólicas em resposta à diminuição do aporte lipídico ingerido, onde as vias metabólicas são reorganizadas para manter a sua homeostase. Em situações metabólicas como stress, reprodução, períodos de jejum e ovogênese, na maioria das vezes são custeadas por essas reservas, garantindo a sobrevivência mesmo em condições adversas (DJAWDAN et al., 1998).

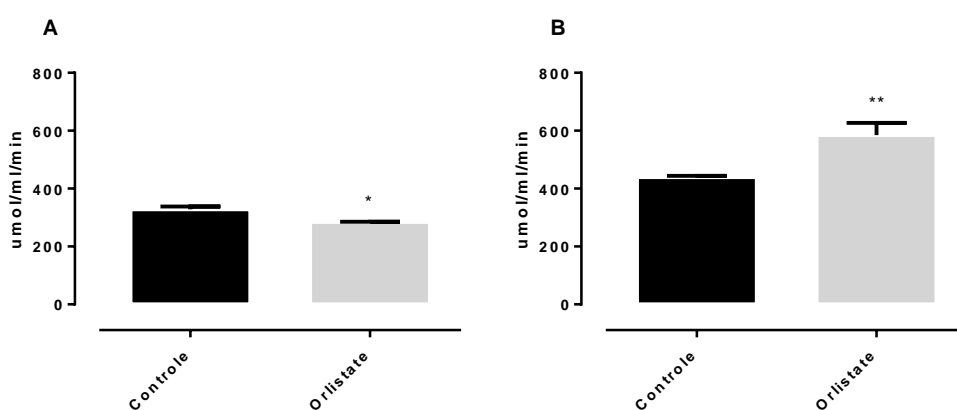
Além disso, muitos insetos holometábolos dependem principalmente dos nutrientes acumulados durante a fase larval para reprodução na fase adulta, embora os carboidratos sejam de grande importância, os lipídeos são de importância fundamental para a reprodução de insetos, os quais pode representar 35% da massa seca do ovócito e servem para várias funções, incluindo seu papel como principal fonte de energia para desenvolvimento do embrião (BAUERFEIND et al., 2007; CARVALHO et al., 2012; LAW; RIBEIRO; WELLS, 1992). E como a maioria dos insetos não sintetiza ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (PUFAs) e nem esteroides tetracíclicos necessários para a síntese de esteróis *de novo*, dependem de fontes exógenas para o desenvolvimento e reprodução bem-sucedidos (BAUERFEIND et al., 2007). Então a condição de baixa absorção e síntese lipídica condicionou as larvas a se alimentarem mais e mobilizar mais a sua reserva do que o normal.

Para avaliar as taxas de mobilização de ácidos graxos do corpo gorduroso através da lipólise, a atividade lipásica foi quantificada no corpo gorduroso, e também no intestino das larvas tratadas (**Figura 24**). Os resultados mostraram que a atividade lipásica intestinal sofreu redução estatisticamente comprovada após o tratamento (**Figura 24A**), efeito que corrobora com a inibição enzimática causada pelo fármaco. Já a atividade lipásica do corpo gorduroso apresentou-se elevada após o tratamento (**Figura 24B**) confirmando a hipótese discutida anteriormente, em que a lipólise é estimulada no CG após o efeito comprovado da tetraidrolipstatina na inibição da lipase intestinal e provável redução da lipogênese para compensação metabólica.

Dessa forma, considera-se que a diminuição na absorção de ácidos graxos por efeito do fármaco na alimentação, que pode ser considerada como uma condição de stress, direciona o metabolismo para ativação de outras vias metabólicas paralelas a fim de manter o suprimento de lipídeos para a produção

de energia dentro das células (LIU et al., 2010). Dessa forma, a síntese *de novo* de ácidos graxos ou a β -oxidação de lipídeos armazenados no corpo gorduroso podem ser ativadas (AMEER et al., 2014). Em *D. melanogaster*, observou-se que os estoques de lipídeos e de carboidrato tem maior resistência às condições de stress, desenvolvendo a capacidade de armazenar um excedente de calorías, que servem como depósitos flexíveis sob demanda (DJAWDAN et al., 1998; HEIER; KÜHNLEIN, 2018). Sugerindo fortemente que a intensa mobilização das reservas de TAG do corpo gorduroso são direcionadas para a via de β -oxidação em *T. castaneum*, como forma de compensação energética.

Figura 24- Medida da atividade lipásica (A) reduzida no intestino e (B) aumentada no corpo gorduroso das larvas de grupo tratado com tetraidrolipstatina (Orlistate®) por 96h comparado com o grupo de larvas controle. As barras representam média \pm erro padrão de 3 determinações independentes. *: Significativamente diferentes por teste t, $p < 0,005$; **: $p < 0,0001$.



Além disso, foi realizada a caracterização da expressão dos genes para Sulfakinina (TcasSK), peptídeos semelhantes à insulina (TcasIn1 e TcasIn2) e para o receptor de insulina (TcasInR), os quais são relacionados a mecanismos de sinalização intracelular e de detecção de nutrientes pelas células neurosecretoras do cérebro nos quais o genes TcasIn1, TcasIn2 e TcasSK são produzidos (HASELTON; FRIDELL, 2010). A partir da análise desses genes espera-se revelar detalhes importantes dos mecanismos neuroendócrinos que associam a nutrição à mudança metabólica após o tratamento com tetraidrolipstatina. As expressões desses genes relacionados foram

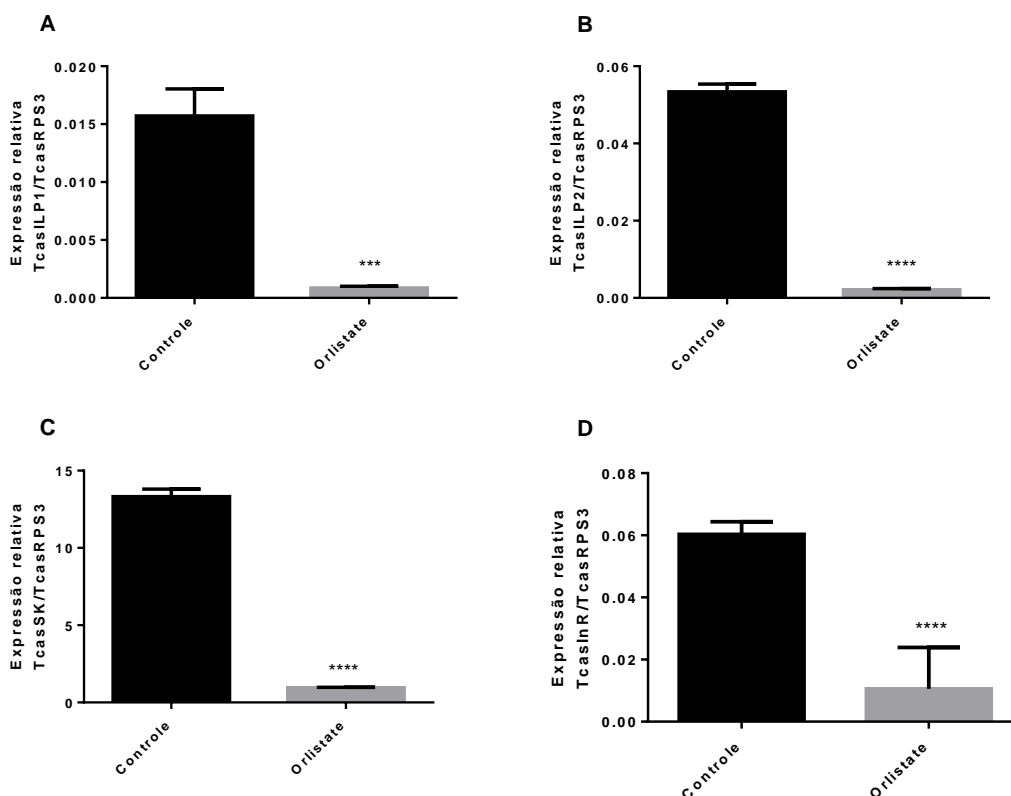
quantificadas na cabeça das larvas tratadas, com exceção do gene para receptores de insulina periféricos que foi quantificado utilizando o corpo total.

A regulação das taxas de alimentação em insetos ocorre por um sistema complexo, por ação de peptídeos semelhantes à insulina (ILP) e de neuropeptídeos importantes, como as Sulfakininas (SK). As sulfakininas são neuropeptídeos que ao serem liberados, inibem a ingestão de alimento pelo inseto, agindo de forma semelhante ao sistema de saciedade Gastrina/Colecistoquinina de mamíferos (DOWNER et al., 2007; LIN et al., 2016).

Em *T. castaneum*, já foi observado que quando há o silenciamento do gene codificante para a sulfakinina, ocorre aumento da ingestão de alimento pelo inseto, evidenciando seu papel na saciedade (YU et al., 2013a; YU et al., 2013b). Neste trabalho, após o tratamento realizado com tetraidrolipstatina nas larvas, observou-se que a expressão para os peptídeos semelhantes à insulina (ILP 1 e 2) reduziram drasticamente (**Figura 25A e B**), assim como a expressão da sulfakinina (**Figura 25C**) e de receptores de insulina periféricos (InR) (**Figura 25D**). Os dados sugerem que as vias de sinalização de sulfakininas e peptídeos semelhantes à insulina neste inseto se sobrepõem, como já observado em *D. melanogaster*, onde esses dois genes são co-expressos por células cerebrais (LIN et al., 2016). Em insetos, as vias de fluxo de energia são bem semelhantes à de mamíferos. Após a alimentação, quando há altos níveis de açúcar circulante na hemolinfa, são liberados peptídeos semelhantes à insulina que exercem efeito semelhante à insulina em mamíferos (GRAHAM & PICK, 2017). Estudos em *D. melanogaster* utilizando dieta rica em açúcar, indicam que a resistência à insulina também pode ocorrer em insetos, acompanhada do aumento dos níveis de lipídeos e da superexpressão de receptores para insulina, o que sugere que as vias metabólicas e os genes relacionados com a fisiopatologia do diabetes tipo 2 possam ser estudadas em insetos (MUSSELMAN et al., 2013). A obesidade é o principal fator fisiopatológico associado ao Diabetes mellitus tipo 2 (FRÜHBECK et al., 2013). A farmacoterapia com tetraidrolipstatina (Orlistate) é muito utilizada no tratamento da obesidade e quando é alcançada a redução de peso de cerca de 5-10% é observado um melhor controle glicêmico, lipídico e da pressão arterial em pacientes com Diabetes tipo 2 (CHUKIR et al., 2018). Esse melhor controle possivelmente está relacionado à redução da resistência à

insulina, condição típica desses pacientes, devido à redução dos níveis de lipídeos, principalmente das lipoproteínas de baixa densidade (LDL). A redução nos lipídeos totais parece estar associada à maior sensibilidade dos receptores de insulina e melhor controle glicêmico (MILES et al., 2002; CHUKIR et al., 2018). Os resultados apresentados neste trabalho indicam que, em *T. castaneum*, o tratamento com tetraidrolipstatina (Orlistate) provoca a redução das reservas de TAG (**Figura 20**) e intensifica a ação de lipases no corpo gorduroso (**Figura 24B**), o que ocasiona maior sensibilidade dos tecidos larvais à insulina, levando à menor expressão de ILP 1 e 2 e do respectivo receptor (InR) para manutenção da homeostase. Adicionalmente, a redução na expressão de Sulfakininas (**Figura 25C**) ocorre como mecanismo de feedback para aumentar o consumo de alimentos pelas larvas (**Figura 21**) a fim de compensar a diminuição da captação de lipídeos da dieta por efeito do fármaco. Portanto, diante dos resultados apresentados, o inseto *T. castaneum* demonstra ser um modelo válido para estudo de vias metabólicas e genes relacionados à resistência à insulina e obesidade.

Figura 25- Expressão relativa dos genes relacionados. Redução da expressão dos genes TcasILP1 (A), TcasILP2 (B) e TcasSK (C) em cabeça de larvas após tratamento com tetraidrolipstatina (Orlistate®), e redução da expressão gênica de TcasInR (D) em tecido de larva total após o tratamento. Resultados para grupo tratado por 96h em comparação ao grupo controle. As barras representam média \pm erro padrão de 3 determinações independentes. (*) Significativamente diferentes por teste t, $p < 0,0001$ para todos os testes.



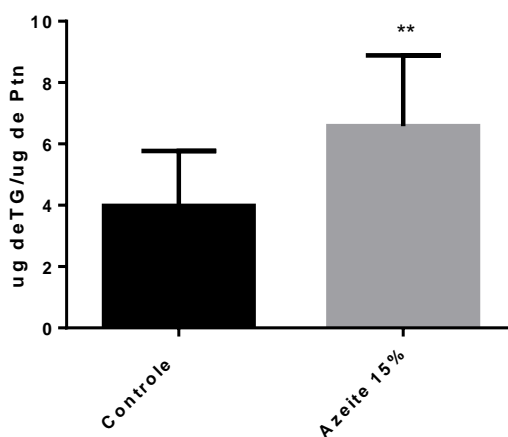
5.5 Expressão gênica de *TcACBP6* em larvas condicionadas à Dieta *High Fat*, avaliação dos índices nutricionais, TAG e expressão de genes relacionados

A avaliação da expressão de *TcACBP6* e o efeito no metabolismo, foi avaliado numa condição contrária ao tratamento com tetraidrolipstatina, neste caso, foi adaptada uma dieta com alto teor de gordura (dieta *high fat*) baseada na incorporação de um óleo, usando azeite de oliva a 15% no disco de farinha de trigo (dieta base). Essa dieta foi adaptada a partir de análises de conteúdo de TAG em determinadas dietas hiper-lipídicas, na qual a dieta com apenas 15% de azeite de oliva já foi suficiente para causar um aumento significativo no

conteúdo total de TAG sem impedir a ingestão e sobrevivência das larvas tratadas (**Figura 26** e **Figura 27**).

Após 96h de tratamento, os níveis de TAG foram medidos dos homogenatos das larvas inteiras (normalizado por mg de proteína do extrato). Os dados mostraram o aumento significativo na concentração de TAG nas larvas alimentadas em dieta *High fat* quando comparadas ao controle apenas em dieta base, observado na **Figura 26**.

Figura 26- Conteúdo de triacilglicerol nas larvas tratadas com dieta a 15% de azeite de oliva após 96h em comparação ao controle, apenas em dieta base. Os valores mostrados são a média e SD; * $p < 0.007$, $n \geq 4$ (Student's t test).



O TAG é a fonte calórica mais importante que contribui para a homeostase energética em animais, apresentando uma alternância crucial para o metabolismo de lipídios estruturais e de sinalização (HEIER; KÜHNLEIN, 2018). Observando a aplicação de dieta *high fat* contínua em ratos, a ingestão causou acúmulo de glicogênio e triglicerídeos no fígado e ácidos graxos livres no sangue (CZAJA, 2010). No *T. castaneum*, foi detectada a mesma resposta evidenciada pelo aumento de TAG no corpo das larvas mantidas em alimentação *high fat* após 96h (**Figura 26**). O dado sugere o aumento no armazenamento de gordura, o qual ocorre pela deposição de ésteres lipídicos em organelas globulares, denominadas gotículas lipídicas, depositadas no corpo gorduroso sendo constituída em grande parte por TAG e esterol (WELTE, 2015). O armazenamento de TAG intensificado é observado na fase larval pela maioria dos insetos, e essenciais para a ovogênese e embriogênese (CARVALHO et al., 2012).

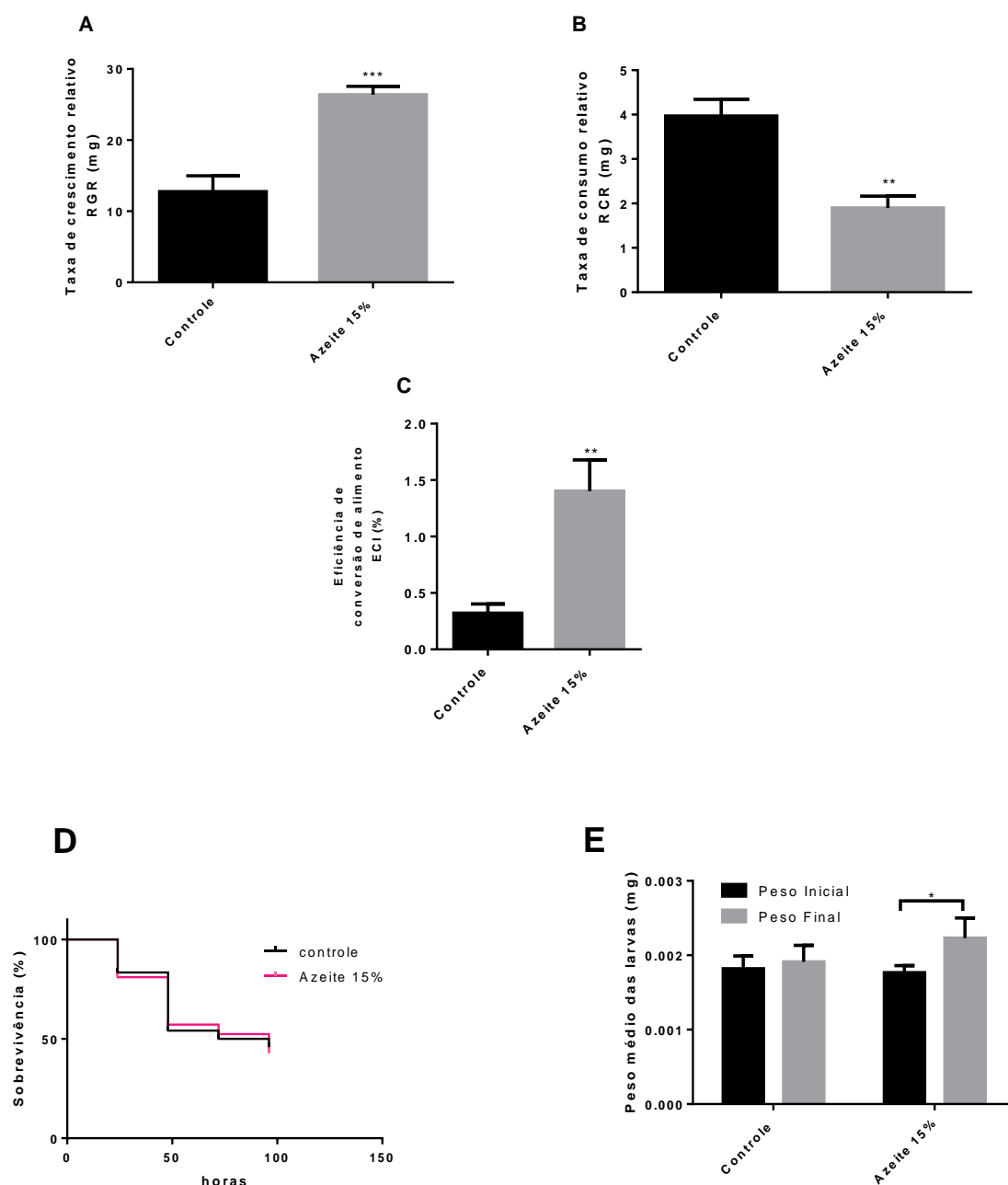
O destaque dado ao corpo gorduroso como estoque de TAG foi observado em gafanhotos submetidos à ovariectomia (remoção dos ovários) pelo qual ocorreu a hipertrofia do corpo gorduroso, justificada pela ausência do processo de ovogênese. Essa hipertrofia do corpo gorduroso também foi observada em fêmeas estéreis mutantes de *D. melanogaster*, que após receberem implantação de ovários da linhagem selvagem restabeleceram as características normais do tecido (DOANE, 1961; Judd, et al. 2011).

As gotículas lipídicas desempenham papéis criticamente importantes para o metabolismo, porém o acúmulo leva ao estresse oxidativo e patologias em vertebrados, como câncer e doença hepática gordurosa não alcoólica. Portanto, evidências mais recentes indicam que as gotículas lipídicas podem não estar apenas diretamente relacionadas à homeostase energética apesar do seu papel crítico no metabolismo lipídico (WELTE; GOULD, 2017).

Analisando os índices nutricionais mostrados na **Figura 27**, foi verificado um aumento na RGR, porém com redução na RCR, ambos significativos. Portanto, a redução no consumo do alimento pela larva (**Figura 27B**) não impediu o seu crescimento (**Figura 27A**), isso pode ser justificado pelo aumento significativo na eficiência de conversão do alimento (**Figura 27C**), ou seja, o alimento rico em lipídeos teve efeito no aumento da conversão desse alimento em reserva energética e conseqüente aumento de massa corporal (**Figura 27E**).

A maior ingestão lipídica resultou em maior ECI, provavelmente referente ao aumento da conversão em TAG no CG, e desta maneira esses dados corroboram com o aumento do peso médio das larvas no final do tratamento, observado na **Figura 27D**. Tendo em vista ainda, que a dieta não provocou alteração na taxa de sobrevivência durante o tratamento (**Figura 27C**).

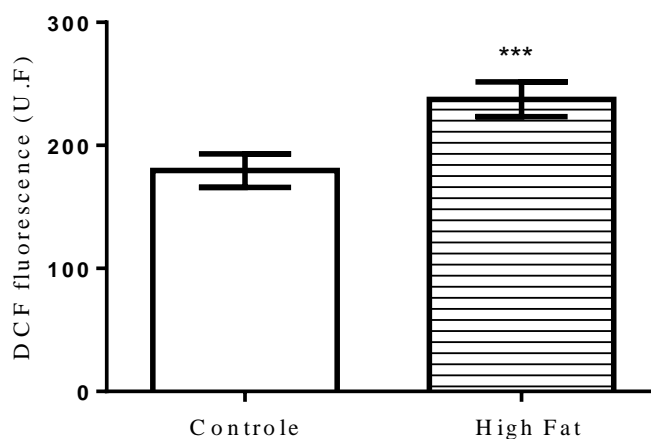
Figura 27- Índices nutricionais da larva do *T. castaneum* após 96h em dieta High fat. (A) RGR = Taxa de crescimento relativo (B) RCR = taxa de consumo relativo; (C) ECI = eficiência da conversão de alimento ingerido; (D) Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier; (E) Peso médio das larvas (mg). Para as análises estatísticas foi aplicado Student's t test não pareado, média e SD; * $p < 0.0001$, $n \geq 3$.



O acúmulo de lipídios, como foi evidenciado no *T. castaneum* após a dieta *high fat*, é descrito em muitos organismos como um fator chave no desenvolvimento e em processos patológicos (HEIER; KÜHNLEIN, 2018). O excesso lipídico é associado a processos de stress oxidativo como hipóxia,

formação de pró-oxidantes químicos, disfunção mitocondrial e estresse do retículo endoplasmático (WELTE; GOULD, 2017), ou seja, o acúmulo excessivo da reserva lipídica no inseto, induz a formação de espécies reativas a oxigênio (ROS) aumentando para níveis prejudiciais que sobrecarregam o sistema de defesa a nível celular e molecular. Esse efeito também foi verificado e pode ser constatado na **Figura 28**.

Figura 28- Quantificação de espécies reativas a oxigênio (ROS) em tecido de corpo gorduroso das larvas após 7 dias de tratamento *High fat* em comparação como o controle não tratado (mantido em dieta base). A medida é feita por intensidade de fluorescência do estado oxidativo (DCF fluorescence) por unidade de fluorescência (U.F). Para as análises estatísticas foi aplicado Student's t test não pareado, média e SD; *** $p < 0.0004$, $n \geq 3$.

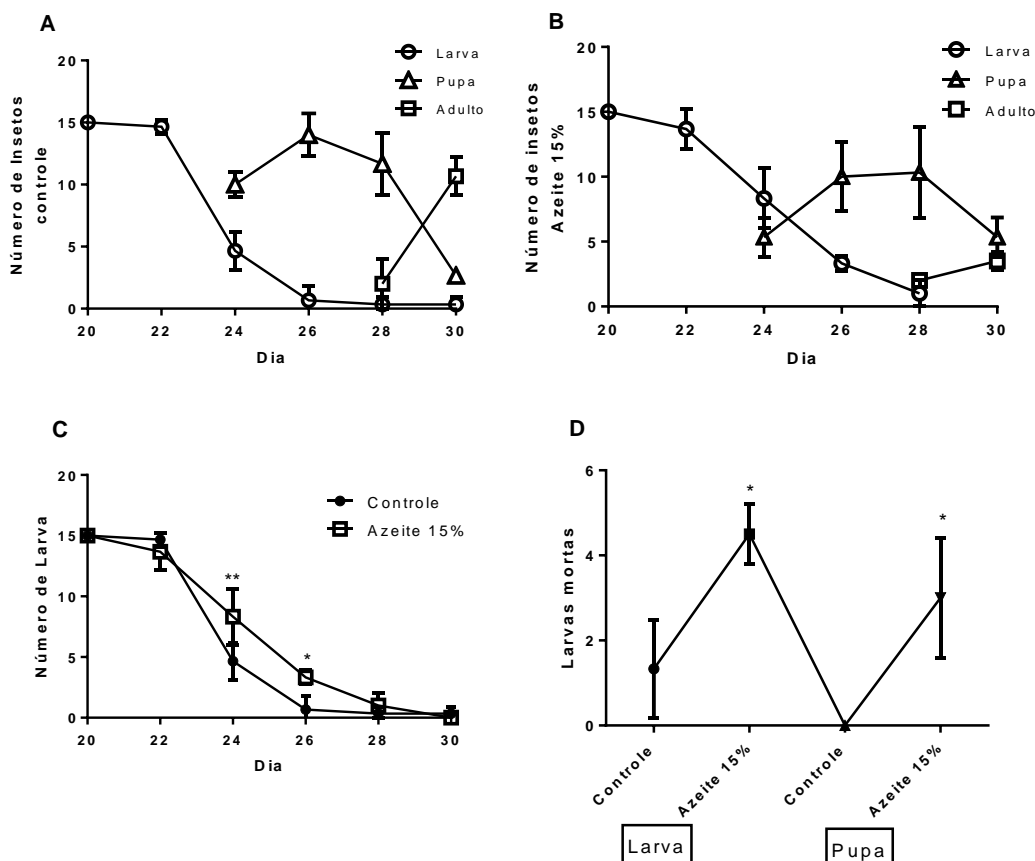


Analisando a continuidade do tratamento nessas larvas, após 7 dias, foi demonstrado que o acúmulo de tecido gorduroso foi suficiente para geração de ROS na larva de *T. castaneum* como visualizado na **Figura 28**. No entanto, durante o período de 96h de tratamento não houve alterações significativas na taxa de sobrevivência (**Figura 27D**).

No entanto houve alteração no seu desenvolvimento com o passar do tempo, observado nitidamente pela não formação de adultos oriundos das larvas tratadas. Essa análise é visualizada na **Figura 29 A e B**, onde ambos o grupo controle (**Figura 29A**) e o tratado (**Figura 29B**) apresentam as mesmas datas de mudança de fase, porém no dia 28, momento em que a pupa vira adulto, o grupo na dieta *high fat* reduz drasticamente. Ou seja, as larvas da dieta conseguem se

manter em desenvolvimento até o final da pupação, pois no momento da eclosão do adulto elas tendem a morrer.

Figura 29- Análise de desenvolvimento a partir das larvas até a fase adulta mantidos em dieta *High Fat* e comparados ao controle em dieta base. Para análise estatística foi aplicado (A e B) análise de correlação; (C) 2way ANOVA, média e SD; * $p < 0.0001$, $n = 3$; (D) 1way ANOVA, média e SD; * $p < 0.5$, $n=3$.



O efeito no desenvolvimento foi também analisado no gráfico da **Figura 29C**, o qual mostra o declínio do número de larvas em resposta a formação da pupa e com isso analisamos o retardo significativo na formação de pupa pelo grupo na dieta. Além do aumento significativo na mortalidade dos grupos em dieta *High fat* durante a fase de larva e pupa em comparação ao controle (**Figura 29D**).

Em virtude da ativação das vias de sinalização envolvidas na proteção de células contra os danos oxidativos, no caso da resposta ao acúmulo lipídico em insetos, ainda não é totalmente compreendido este mecanismo molecular. Alguns trabalhos mostram a ação de proteínas de choque térmico (HSP) e

proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (HEINRICHSEN et al., 2014), peroxidação de lipídios e modificação de proteínas (SATAPATI et al., 2012; SITNICK; BODINE; RUTLEDGE, 2009) e resistência à insulina (MATSUMOTO et al., 2015; TOYE; DUMAS; BLANCHER, 2007).

Esse tipo de estudo é frequentemente observado em *D. melanogaster*, pelo qual a dieta hiperlipídica causou o acúmulo de gordura, disfunção cardíaca, aumento de triglicérides, diminuição da tolerância ao estresse, diminuição de vida útil (DIOP; BIRSE; BODMER, 2017; HEINRICHSEN; HADDAD, 2012) e mais recentemente respostas transgeracionais à dieta ancestral entre os genótipos e sexos através de gerações de primeiro e segundo descendentes (DEW-BUDD; JARNIGAN; REED, 2016).

Em contra ponto, análises de intervenções ambientais, como a temperatura e a restrição calórica, forneceu um excelente sistema de equilíbrio entre o dano oxidativo, o envelhecimento e a expectativa de vida (ZHENG; II; HELFAND, 2005). A restrição dietética já foi confirmada em vários organismos, incluindo leveduras, invertebrados e mamíferos, com efeito na extensão do tempo de vida (PIPER; PARTRIDGE, 2007). Os efeitos na longevidade geral são conservados em uma série de organismos modelo (Lee et al. 2017).

Além disso, existem dados que comprovam que a exposição a um extrato etanólico de larvas como a do *Tenebrio molitor* apresentam efeitos antilipogênicos e antiobesidade, reduzindo o acúmulo de lipídios e o conteúdo de TAG nos adipócitos maduros em até 90% sem redução da viabilidade celular (SEO et al., 2017). Isso pode ocorrer por regulação de neuropeptídeos relacionados ao apetite que leva a redução da ingestão de alimentos e o peso corporal. Efeitos antilipidêmicos também foi identificado em glicosaminoglicano (GAG) do grilo *Gryllus bimaculatus* (AHN et al., 2015, 2016).

Contudo, em todos os organismos, a dieta *high fat* promove um aumento da oferta de triglicérides e ácidos graxos e, conseqüentemente, essa reserva excedida induziria o aumento da oxidação dos ácidos graxos, a fim de produzir energia (PAULA et al., 2016). No entanto, nas análises com o *T. castaneum* não foi observado efeito da atividade lipásica no corpo gorduroso que sustente essa afirmação (**Figura 31**), tão pouco aumento da expressão da *TcACBP6* (**Figura 30**), a qual até o presente momento indicou regular mais efetivamente

o desvio de ácidos graxos para β oxidação, pois nesse período de larva, os lipídeos ingeridos são desviados para lipogêneses e com isso regulando negativamente o catabolismo.

Figura 30- Expressão relativa de *TcACBP6* nas larvas alimentadas com dieta *High-fat* após 96h comparado ao controle. Os valores mostrados são a média e SD; * $p < 0.0001$, $n \geq 3$ (Student's t test).

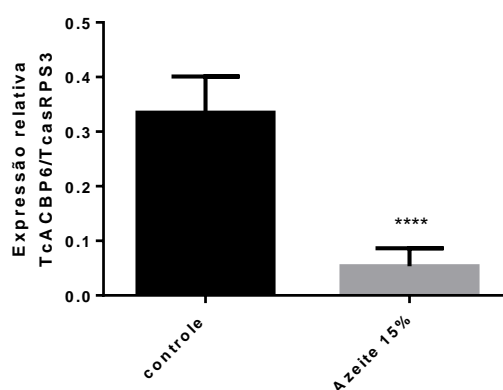
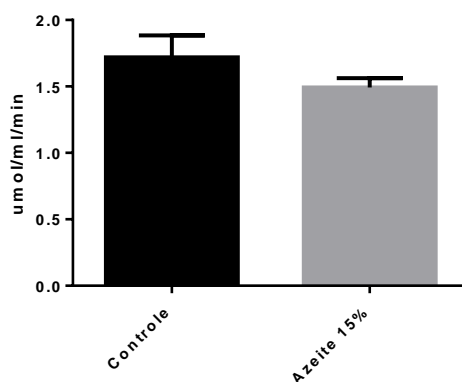


Figura 31- Medida da atividade lipásica no corpo gorduroso das larvas alimentadas em dieta *high fat* por 96h comparado com o grupo de larvas controle. As barras representam média \pm erro padrão de 2 determinações independentes. $p < 0,05$.



A homeostase do armazenamento de lipídeos e a dinâmica das gotículas lipídicas são controladas pelo balanço entre lipólise e lipogênese, processos os quais são controlados por proteínas de ligação (ZHENG; YANG; XI, 2016), como as ACBPs e por proteínas de ligação a elementos reguladores de esteróis (SREBPs). No contexto em que as larvas do *T. castaneum* estão apresentadas,

podemos observar um desequilíbrio afetado pela aparente lipogênese na excessiva formação de reserva lipídica no corpo gorduroso da larva em torno de 20 dias, a partir disso, foi observado uma redução da expressão gênica de *TcACBP6* (**Figura 30**) apresentando uma resposta oposta àquela vista no tratamento com a Tetraidrlipstatina (**Figura 23**).

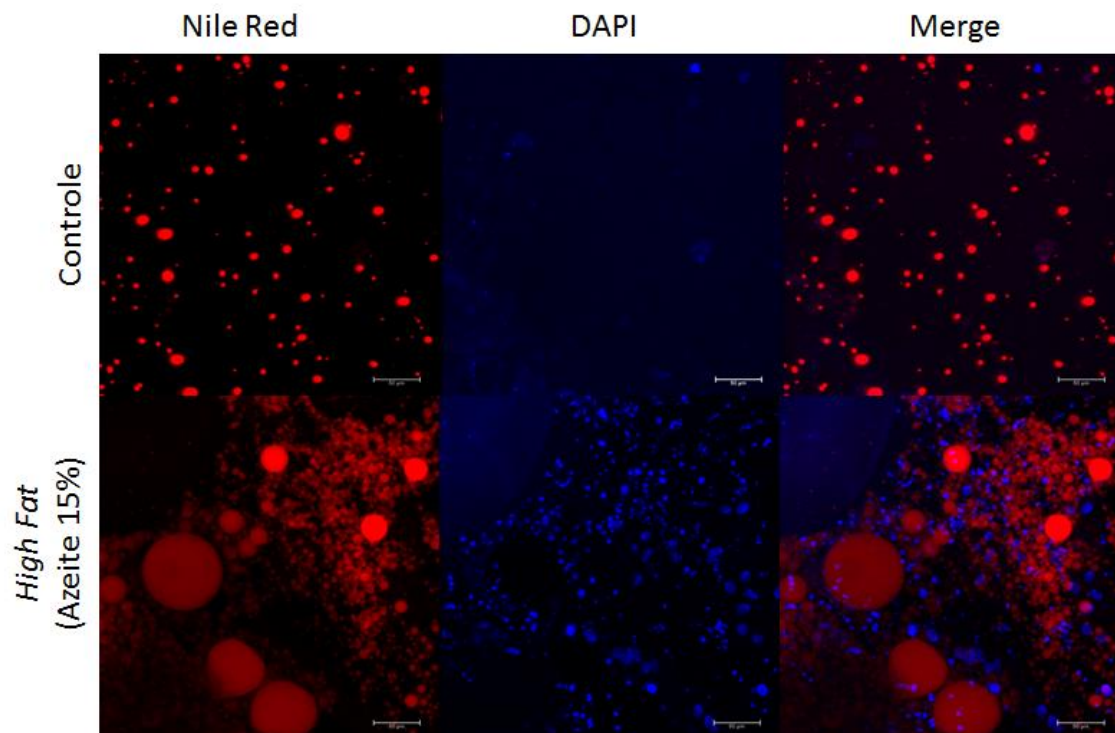
Essa resposta configura a ação previamente estabelecida do papel dessa ACBP associada aos processos lipolíticos da célula, e portanto, reduzida na condição de alimentação contínua com alto teor de gordura e estímulos lipogênicos.

A relevância fisiológica da ACBP na regulação do metabolismo lipídico sob dietas ricas em gordura não é clara. Estudo desenvolvido para análise de expressão de transcritos foi realizada em ratos transgênicos com superexpressão de *ACBP* em dieta gordurosa. Com isso, os animais transgênicos na alimentação contendo ácidos graxos de cadeia longa não exibiram alterações nos níveis de glicose ou insulina, mas exibiram níveis aumentados de RNAm de PPAR α e SREBP-1 no fígado os quais são importantes na adipogênese (OIKARI et al., 2008), o que acarretaria na expressão dessa *ACBP* nos processos de síntese lipídica.

Outro dado importante apresentado por LUDEWIG et al. (2011), examina a expressão diferencial da *ACBP* durante a adipogênese, pois esse gene expressa muitas variantes de transcrito que codificam as isoformas da *ACBP* e todas atuando no metabolismo de lipídeos. Com isso, foi observado a expressão de uma *ACBP-1G* que é regulada negativamente durante a adipogênese em uma linhagem de células progenitoras humanas SGBS, sendo expressa de maneira semelhante ao que foi observado pela *TcACBP6*, enquanto isso, outras isoformas apresentaram diferentes perfis de expressão gênica na mesma condição.

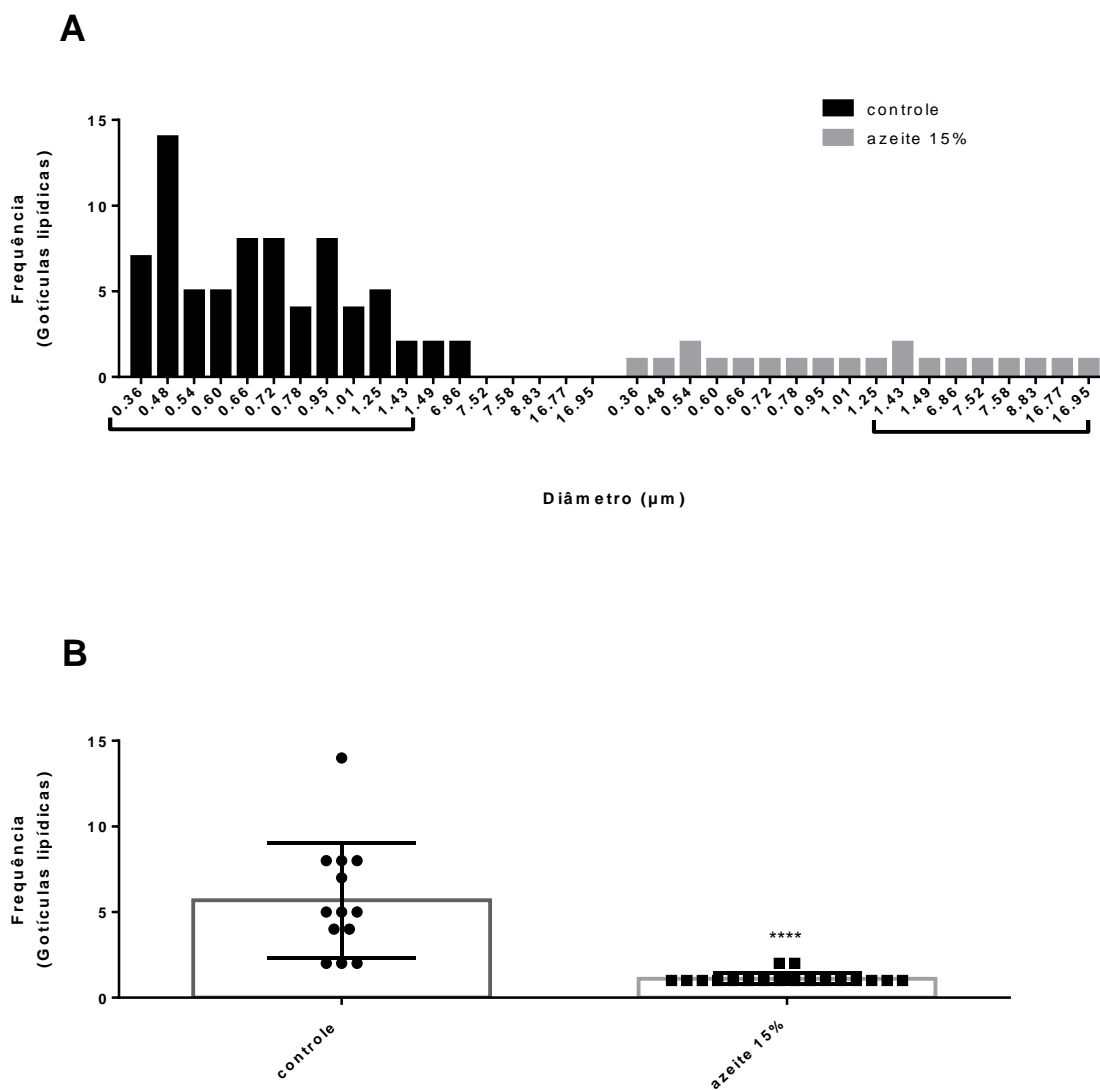
Nesse contexto, analisamos na **Figura 32** o perfil das gotículas lipídicas apresentadas na condição de tratamento em dieta *high fat*. Essa análise foi realizada em microscópio confocal e corados com vermelho do Nilo, específico para coloração de lipídeos, e DAPI para coloração de núcleo (ALVES-BEZERRA et al., 2017).

Figura 32- Microscopia de gotículas lipídicas do corpo gorduroso de larvas mantidas em dieta base como controle de análise comparatória (A) e de larvas tratadas em dieta hiper gordurosa (*High fat*) com 15% de azeite de oliva após 7 dias. As gotículas lipídicas foram coradas com Vermelho do Nilo (*Nile Red*) e o núcleo com DAPI. Foram fotografadas a partir de seções óticas do corpo gorduroso e são visualizadas com leitura de barras de escala = 30 μm .



Pelas imagens, observamos alteração no perfil das gotículas lipídicas após o tratamento *High fat* em relação ao controle, esse efeito é melhor visualizado na **Figura 33A** a qual representa a frequência de distribuição da gotículas pelo seu diâmetro, observando maior frequência de gotículas maiores, a partir de 1,49 μm .

Figura 33 - Histograma de tamanho representando a distribuição de tamanho das gotículas lipídicas do corpo gorduroso (A) e a representação da média e desvio padrão da frequência relativa das gotículas lipídicas (B) com análise estatística por Student's t test, análise unipareada entre os grupos; ****: $p < 0.0001$.



Na condição de uma dieta *high fat*, o perfil de gotículas lipídicas no CG da larva apresentou redução de variação de distribuição de tamanhos (**Figura 33B**) dessas gotículas, com redução da frequência de gotículas menores e presença de gotículas maiores, destacado na **Figura 33A**.

No *T. castaneum* não conseguimos definir se há aumento da via de síntese endógena ou β oxidação nas larvas em dieta *high fat*, contudo verificamos a atividade da lipase no CG, pela qual podemos considerar um indicativo para mobilização lipídica e que não teve alteração significativa, portanto, é provável que a via da β oxidação esteja reduzida enquanto a via de síntese endógena esteja estimulada.

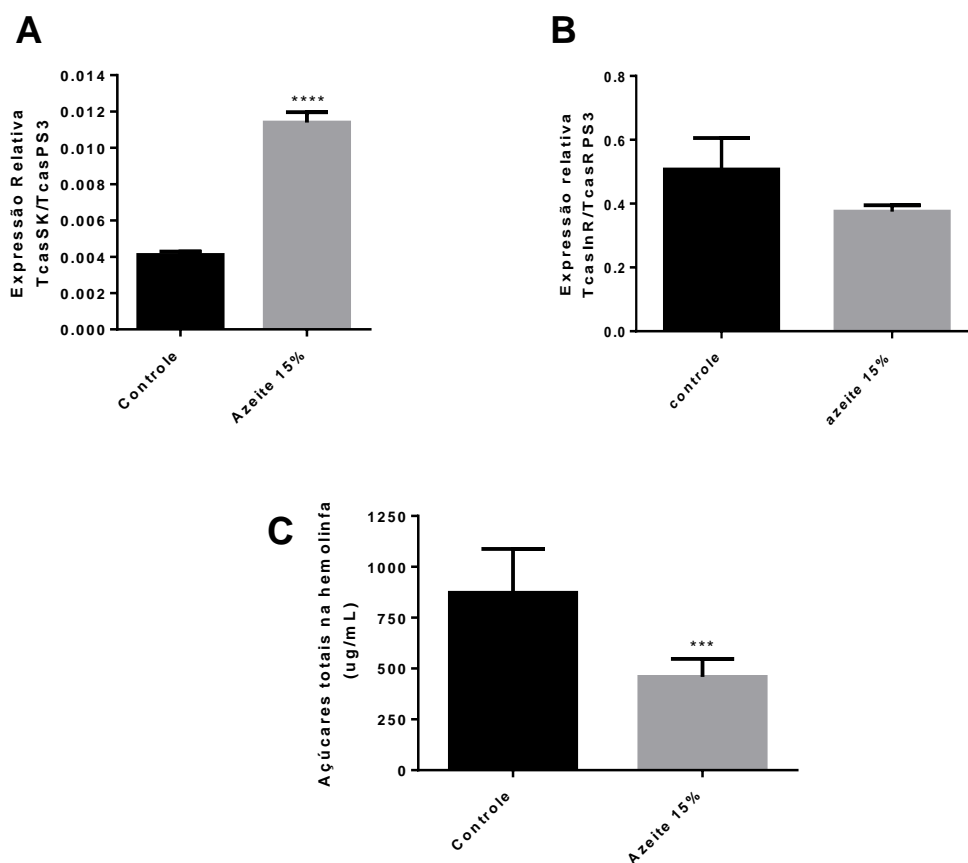
Em insetos, principalmente evidenciado em *D. melanogaster*, o controle dos processos biossintéticos é regulado pela proteína de ligação ao elemento regulador do esterol (SREBP) que nos insetos tem papel essencial na transcrição de genes necessários para a síntese e absorção de ácidos graxos visto em intestino médio e CG de larvas (KUNTE; MATTHEWS; RAWSON, 2006; LIU; HUANG, 2013). Dados mostram que a *D. melanogaster* quando não expressa a SREBP, morre antes das larvas atingirem o terceiro instar com quantidade bastante reduzida de ácidos graxos (KUNTE; MATTHEWS; RAWSON, 2006). Porém existem poucos estudos que se assemelham a essa condição de stresse oxidativo no *T. castaneum* para inferir melhor sobre a resposta nessa via lipogênica.

Portanto, considerando os dados de estudo em camundongos, o acúmulo de gotículas lipídicas na hipóxia ocorre devido à absorção de ácidos graxos da dieta, enquanto a síntese *de novo* de ácidos graxos é reprimida devido a hipóxia gerada pelo estresse oxidativo, com isso foi avaliada a abundância de gotículas lipídicas na hipóxia (BENSAAD et al., 2014). Caminho pelo qual podemos inferir que a síntese de ácidos graxos *de novo* tende a diminuir durante a provável hipóxia no *T. castaneum*, considerando assim que a fração de gotículas lipídicas maiores, assim como o aumento do conteúdo de TAG (**Figura 26**) que podem ser resultantes da absorção de lipídeos da dieta.

Alguns estímulos para a adipogênese em dieta gordurosa após 96h no *T. castaneum* podem ser observados na **Figura 34**, na qual verificamos que não houve alteração significativa na expressão do gene para o receptor de insulina (*TcasInR*) (**Figura 34B**) em resposta ao menor conteúdo de açúcares totais na hemolinfa comprovado na **Figura 34C**, tendo em vista que o consumo relativo do alimento foi menor, o que justifica também a resposta da sulfaquinina

(*TcasSK*) na aumentada, regulando positivamente o estímulo da saciedade no inseto.

Figura 34- Expressão relativa dos genes relacionados: *TcasSK* (A) da cabeça das larvas e *TcasInR* (B) em tecido de larva total após a dieta *high fat* por 96h em comparação ao grupo controle em dieta base. As barras representam média \pm erro padrão de 3 determinações independentes. (*) Significativamente diferentes por teste t, $p < 0,0001$ para todos os testes. (C) Conteúdo de açúcares totais na hemolinfa da larva em dieta *high fat* após 96h (ANOVA, $p < 0,05$).



Analisando experimentos em *R. prolixus*, a inibição da expressão de um gene para peptídeo semelhante a insulina (*Rhopr-ILP*) por RNAi promoveu um aumento no conteúdo lipídico no corpo gorduroso e na hemolinfa, tanto em ninfas de quinto instar não alimentadas como recentemente alimentadas (DEFFERRARI; ORCHARD; LANGE, 2016). Porém essa interferência de *ILP* no metabolismo de lipídeos ainda é confuso, pois analisando uma forma ativada do receptor de insulina em *D. melanogaster*, a sua expressão gênica no corpo

gorduroso de fêmeas levou a um aumento nos depósitos de TAG (NÄSSEL; BROECK, 2016), indicando um efeito contrário.

Flutuações no consumo de energia são integradas por um sistema endócrino o qual coordena as vias catabólicas e anabólicas do metabolismo do TAG entre vários organismos (HEIER; KÜHNLEIN, 2018). A via de sinalização da insulina é considerada como uma via de detecção de nutrientes para controlar o crescimento e o metabolismo dos insetos. Então para entender sobre como o excesso de uma dieta afeta a resistência à insulina, estudos com a *D. melanogaster* afirmam que as vias que conduzem à resistência são conservadas de forma evolutiva e que pelo menos algumas dessas vias dependem do açúcar da dieta (PALANKER MUSSELMAN et al., 2011). Então apesar da dieta também ser rica em carboidratos, essa condição de tratamento ainda não foi suficiente para caracterizar a resistência insulínica, apenas a estimulação da adipogênese.

Além disso podemos observar que o consumo relativo (RCR) (**Figura 27**) foi menor comparado ao controle, e foi condizente à expressão aumentada de *TcasSK*, sinalizando aumento de saciedade, e por isso manteve a expressão de *TcasInR*, no entanto com redução dos açúcares totais na hemolinfa (**Figura 34**).

Todos os efeitos analisados até aqui constroem a ideia de que o gene para *TcACBP6* tem sua expressão estimulada na tentativa de regulação da homeostasia lipídica por via de catabolismo lipídico, nessa perspectiva, foi realizada a técnica de silenciamento por RNA interferente (RNAi), sendo mais específica para investigação de função gênica.

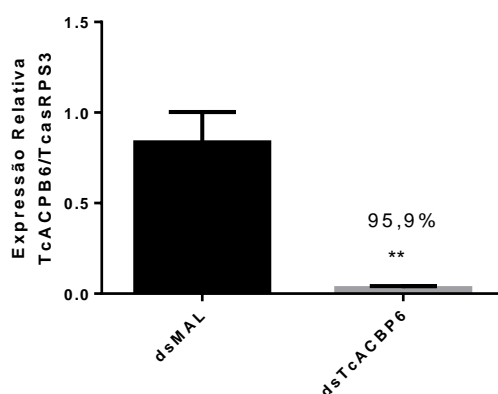
5.6 Inibição da expressão da *TcACBP6* por RNAi em larvas de *T. castaneum* e seus efeitos

O silenciamento ocorreu a partir da injeção de 0,15µg de RNA fita dupla (dsRNA, do inglês, *double stranded RNA*) específico para *TcACBP6* aplicado diretamente nas larvas com 20 dias (L20). Após a injeção, as larvas foram avaliadas quanto a sua mortalidade e desenvolvimento acompanhados durante 7 dias. Uma taxa irrelevante de mortalidade foi observada tanto para o grupo

controle quanto para o grupo tratado com dsRNA, nenhuma interferência fenotípica foi observada, e o desenvolvimento da pupa e emergência dos insetos adultos manteve-se normal.

Após 3 dias da injeção, foi extraído o RNA do tecido total da larva e foram sucedidas as análises de expressão por RT-qPCR a fim de verificar a validade do silenciamento. Assim, na **Figura 35**, pode-se constatar que houve a inibição da transcrição do gene alvo em 95% na larva inteira.

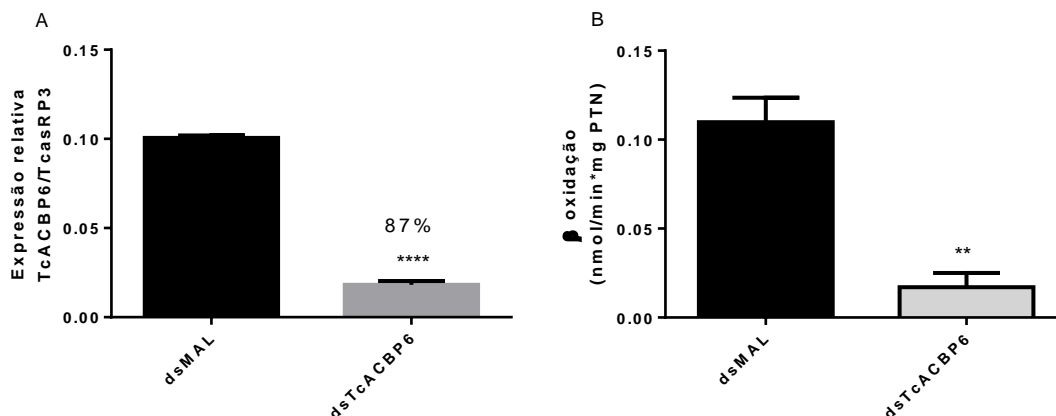
Figura 35- Expressão de TcACBP6 nas larvas de *T. castaneum* por injeção de 0,15µg do dsRNA (dsTcACBP6), analisado após 3 dias em comparação ao controle não relacionado de dsMAL. Os valores mostrados são a média e SD; **p < 0.0028 (Student's t test).



Para avaliar o efeito do silenciamento, foram seguidos ensaios de dosagem de TAG, medida de beta oxidação e microscopia confocal do corpo gorduroso. Os ensaios tiveram o intuito de elucidar a hipótese de que a expressão da TcACBP6 está relacionada à indução do transporte de acil CoA de cadeia longa para via de catabolismo na célula. Dessa maneira, os grupos de larvas silenciadas após 3 dias da injeção de 0,15µg de dsTcACBP6 foram analisadas.

Os efeitos no metabolismo de lipídeos foram avaliados através do ensaio de β oxidação. Para esse experimento, o grupo de larvas utilizado teve sua inibição gênica em 87% e a medida foi realizada em larva total após 7 dias da injeção (**Figura 36**).

Figura 36- Expressão gênica de *TcACBP6* nas larvas de *T. castaneum* silenciadas em 87% (A); Medida de β -oxidação (B), considerando o controle não relacionado dsMal. Os valores mostrados são a média e SD; significância em (A) * $P < 0,001$ e (B) * $P < 0,003$ (Student's t test).

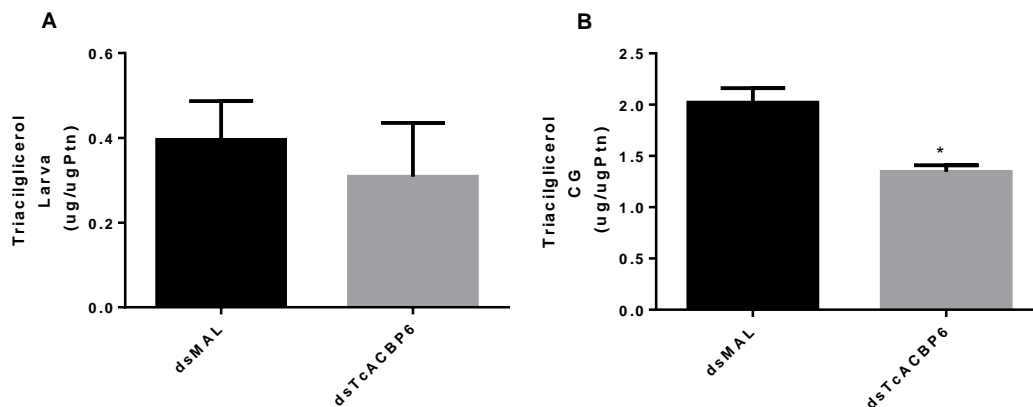


Foi observado que a *TcACBP6* silenciada reduziu significativamente a medida da via de β -oxidação. Esse fato sugere que na ausência da expressão de *TcACBP6* não há liberação eficiente da acil-CoA para esta via. Então até esse momento a hipótese da função da *TcACBP6* na mobilização de lipídeos foi fortemente sustentada pelos dados mostrados.

A partir desse efeito, esperou-se que em consequência da redução da β oxidação haveria um acúmulo do estoque de TAG no CG. Sendo assim, foi conduzida a análise do conteúdo de TAG no tecido total e corpo gorduroso das larvas silenciadas.

A análise do conteúdo foi normalizada por mg de proteína do tecido e pode ser visualizada na **Figura 37**. O resultado indicou redução significativa de TAG especificamente no corpo gorduroso (**Figura 37B**). A dosagem realizada no corpo total não apresentou diferença significativa, provavelmente por interferências de outros tecidos no contexto total da larva (**Figura 37A**).

Figura 37- Conteúdo de triacilglicerol normalizado por proteína ($\mu\text{gTAG}/\mu\text{gPtn}$) na larva inteira (A) e corpo gorduroso (B) das larvas silenciadas após 3 dias da injeção de dsRNA para *TcACBP6* em comparação ao controle não relacionado, dsMal. Os valores mostrados são a média e SD; (*): $p < 0.05$ (Student's t test).



Observando melhor a sinalização para mobilização lipídica observamos que no inseto *R. prolixus*, as reservas de TAG são mobilizadas durante a segunda e terceira semana após a refeição de sangue e é provável que o DAG gerado nesse processo seja transferido para o carregamento de lipoforina e seja então transportado para outros órgãos (ALVES-BEZERRA et al., 2016). No caso do *T. castaneum* esse processo não tem um período específico, apenas podemos sugerir que a mobilização irá ocorrer mais intensificada em condições fisiologias de maior demanda energética, como na mudança de fase, ovogênese e voo, e com isso, a intensificação da β oxidação.

Com isso, outra possibilidade de avaliar esse efeito é considerando quando muitos genes na via de β -oxidação são regulados positivamente por inanição (PALANKER et al., 2010), que no caso do *T. castaneum* ocorre na fase de pupa (inicialmente analisada em P1 e P2). Nessa análise, observamos que existe um progressivo aumento da expressão da *TcACBP6* de P1 para P2, o que nos leva a confirmar a função da expressão desse gene correlacionada com essa via catabólica.

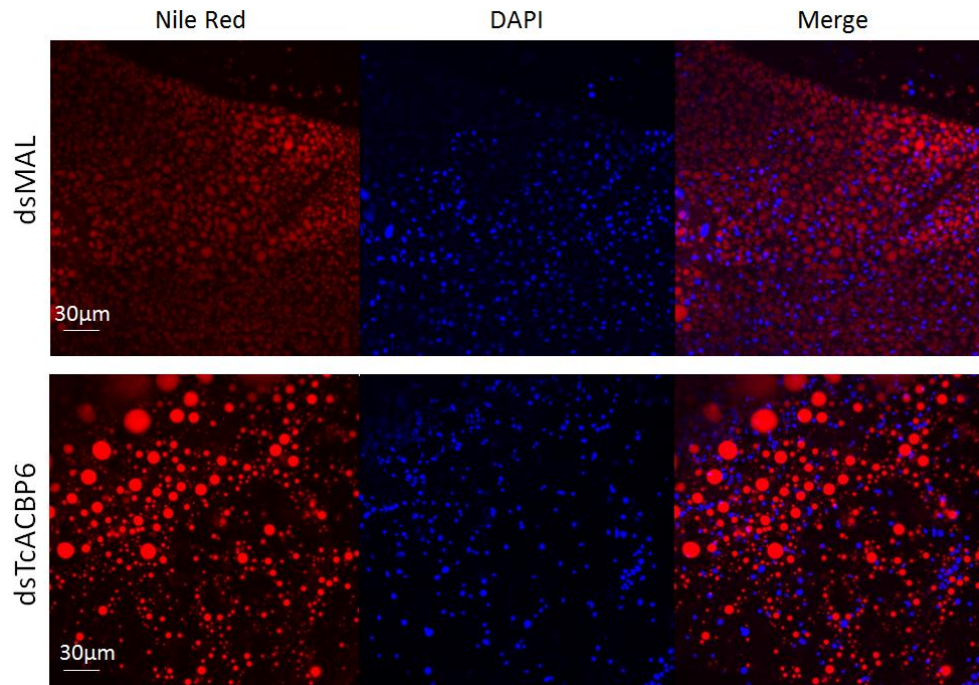
A expressão de uma ACBP semelhante estudada no corpo gorduroso de *R. prolixus*, apresentou sua expressão induzida pela injeção de AKH, hormônio indutor da mobilização de ácidos graxos no corpo gorduroso, indicando que essa

proteína, nomeada *RpACBP-1*, pode estar envolvida na mobilização dos estoques de TAG (ALVES-BEZERRA et al., 2016).

Para confirmar e elucidar melhor esses dados dos efeitos do silenciamento, foi prosseguido o ensaio de microscopia do corpo gorduroso a fim visualizar o comportamento das gotículas lipídicas nesse tecido. Essa análise foi realizada em microscópio confocal e corados com vermelho do Nilo, específico para corar lipídeos, e DAPI para coloração de núcleo (ALVES-BEZERRA et al., 2017) (**Figura 38**).

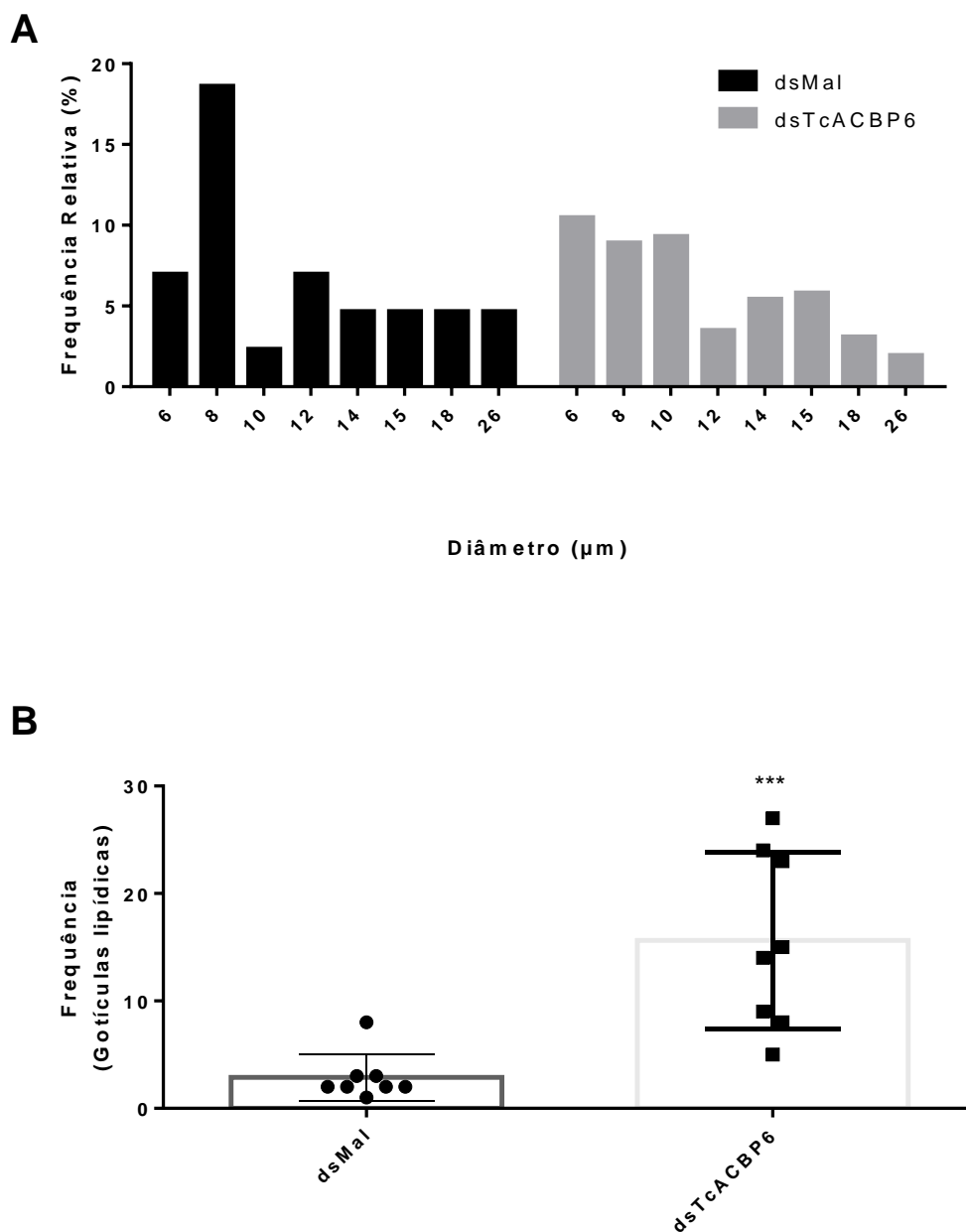
A análise das gotículas lipídicas revelou um padrão de gotículas diferente, com maior espaçamento e aumento aparente de uma fração dessas gotículas nas larvas deficientes de *TcACBP6* (*dsTcACBP6*) (**Figura 38A**) em comparação ao controle (*dsMAL*) (**Figura 38B**).

Figura 38- Gotícula lipídica do corpo gorduroso de larva silenciada após 3 dias. Coradas com Vermelho do Nilo e com DAPI para identificação do núcleo. Foram fotografadas a partir de seções óticas de corpo gorduroso dissecados do controle (*dsMAL*) e de larvas silenciadas (*dsTcACBP6*). Barras de escala = 30 μ m.



Nesse contexto, apesar da diminuição no conteúdo de TAG avaliado na **Figura 37B**, foi observado um padrão diferente (com a presença de gotículas maiores) no CG pela microscopia, pelo qual foi avaliado melhor por análise em histograma de tamanho dessas imagens (**Figura 39**).

Figura 39- Histograma de tamanho representando a distribuição de tamanho das gotículas lipídicas do corpo gorduroso (A) e a representação da média e desvio padrão da frequência de tamanho das gotículas lipídicas (B) com análise estatística por Student's t test, unipareada entre os grupos; ***: $p < 0.0008$.



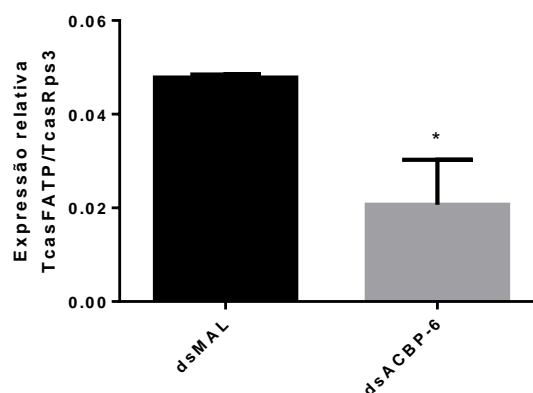
Pelo histograma, observa-se que foi reduzida a frequência de gotículas de tamanho maior, sem aumentar a frequência de gotículas menores, sendo melhor observado nos diâmetros 12, 18 e 26 μm . E pequeno aumento na frequência de

gotículas maiores de 14 e 15 μm . Portanto, há alteração morfológica das gotículas lipídicas como resultado do consumo sutil destas para mobilização, porém sem aumento ou reabastecimento dessa reserva, o que fortalece o dado de conteúdo de TAG reduzido no corpo gorduroso da larva silenciada (**Figura 37B**). Ou seja, podemos inferir que houve a redução da β oxidação, porém não houve resposta de estimulação da lipogênese. Esse dado ainda pode ser analisado na **Figura 39B**, onde mostra a média da frequência de tamanho com variação aumentada das gotículas lipídicas.

Existe uma diversidade de funções que destaca as gotículas lipídicas como organelas muito adaptáveis, desempenhando diferentes funções em diferentes contextos biológicos como desde o armazenamento de precursores hidrofóbicos de vitamina, como de sinalização e o manejo do retículo endoplasmático e do estresse oxidativo (WELTE; GOULD, 2017). Estudos mais recentes tem mostrado que as gotículas lipídicas podem não só estar diretamente relacionados à homeostase energética, evidenciando papéis celulares ainda mais amplos, como modulação da disponibilidade de proteínas e sinalizam lipídios no núcleo, centros de tráfego de ácidos graxos e neurodegeneração (WELTE, 2015). Com isso várias hipóteses podem estar associadas as alterações nessas gotículas.

Nessa busca, foi analisada a expressão de uma proteína transportadora/ativadora de ácidos graxos de cadeia longa de *T. castaneum* (*TcasFATP/ACSL*) nas larvas silenciadas (dsTcACBP6) (**Figura 40**).

Figura 40- Expressão de *TcasFATP/ACSL* em larvas silenciadas em *TcACBP6*, comparado com o controle *dsMAL*. As barras representam média \pm erro padrão de 3 determinações. (*): $p < 0.01$ (Student's t test).



Esse resultado mostra que houve redução da expressão da *TcasFATP/ACSL* em decorrência da inibição da expressão da *TcACBP6*, ou seja, a redução da proteína *TcasFATP/ACSL* é resultado da redução da regulação de entrada/ativação da acil CoA (ácido graxo ativado) em meio intracelular. Portanto, o efeito da expressão de *TcACBP6* na expressão de *TcasFATP/ACSL* pode ser sincronizado, pois a medida que tem menos proteína ligadora de acil CoA (*TcACBP6*) a célula tende a reduzir a entrada/ativação dessa molécula de ácido graxo, conseqüentemente, reduzindo *TcasFATP/ACSL*.

A redução da expressão da *TcasFATP/ACSL* pode ser correlacionada com a resposta do silenciamento do gene de *FATP* em *Bombyx mori* (*BmFATP*), onde o efeito causou a redução do conteúdo de lipídeos armazenados no citoplasma (OHNISHI et al., 2009; OHNISHI; HULL; MATSUMOTO, 2006). Já em *R. prolixus*, o silenciamento de uma enzima ACS de cadeia longa resultou em aumento no conteúdo de TAG do corpo gorduroso após 15 dias, as análises mostraram concomitante redução das taxas de β -oxidação e aumento da síntese *de novo* de lipídeos. No entanto, a origem do aumento do conteúdo de TAG após o silenciamento foi atribuído à síntese de lipídeos, já que a via de absorção de ácidos graxos proteína-dependente encontrava-se ausente (ALVES-BEZERRA et al., 2016). Podemos concluir que foi o mesmo efeito só que por inibição da expressão de uma *FATP/ACSVL* que levou a redução do conteúdo de TAG e

consequente redução de β -oxidação, comprovando essa relação da TcACBP6 e TcasFATP/ACSL.

Podemos observar também dados que mostraram que como as enzimas ACSs catalisam a ativação de ácidos graxos de cadeia longa por adição da Coenzima A, consequentemente afetam a absorção de ácidos graxos exógenos, e essa reação de acilação vetorial aprisiona o ácido graxo dentro da célula e o direciona para a etapa de β -oxidação (EHEHALT et al., 2006). Contudo a etapa de β -oxidação foi inicialmente reduzida pelo *knockout* da TcACBP6, que influenciou na redução de TcasFATP/ACSL e portanto, a ativação em Acil-CoA é reduzida e os ácidos graxos não conseguem ser utilizados como fonte energética durante a β -oxidação de maneira eficiente. Então podemos supor que a absorção da dieta deve estar ativa mantendo as necessidades energéticas da larva. E com isso, é possível que a síntese *de novo* também esteja prejudicada causando a redução de TAG no corpo gorduroso e consequentemente as alterações morfológicas observadas na microscopia.

Em *C. elegans* foi constatada que a perda funcional da ACBP-1, uma ACBP clássica semelhante a TcACBP6, reduziu os níveis de TAG e ocasionou alterações na morfologia e quantidade de gotícula lipídica no intestino, sendo ainda constatado que a anulação de todas as ACBPs basais pode levar ao atrasado no desenvolvimento e armazenamento anormal de lipídios intestinais e aumento da β oxidação (ELLE et al., 2011). Ou seja, cada ACBP pode desempenhar uma função distinta num mesmo organismo, porém compensatórias entre si.

6. CONCLUSÃO

Esse estudo identificou com base no genoma do *T. castaneum*, 6 sequências gênicas codificantes para ACBPs distintas, as quais foram caracterizadas inicialmente por predição bioinformática. Foi identificando genes de domínio único ACBP (TcACBP1,3,4 e 6), e genes com diferentes domínios, como domínio ankirina (TcACBP5) e para o complexo de golgi (TcACBP2). A predição bioinformática caracterizou a prevalência dessas proteínas em meio citoplasmático e suas diferenças em estimativa de massa molecular e ponto isoelétrico. Além disso, a predição de sítio de fosforilação e peptídeo sinal foi ausente, porém foi positiva para predição de domínio transmembrana apenas para TcACBP 3 e 4. Dentre os genes para ACBPs identificados, foi iniciado o estudo de expressão gênica com a *TcACBP6*, um gene *ACBP* clássico e mais recente depositado (2016).

A caracterização do gene de *TcACBP6* no ciclo de vida do *T. castaneum* revelou maior expressão nas fases de adulto com 3 dias, larva com 20 dias e pupa no fim do estágio, respectivamente. Interessantemente, houve um perfil de expressão aumentado entre as fases de pupa da recém formada para o fim do estágio, indicando uma possível necessidade desta *TcACBP6* no processo de muda. Com isso, analisando os principais tecidos envolvidos na expressão da *ACBP*, foi identificada expressão significativa no corpo gorduroso tanto das larvas como nas pupas, identificando um transporte de lipídeos maior nesse tecido o qual é o maior responsável pela síntese e catabolismo dos ácidos graxos.

Analisando a expressão do gene *TcACBP6* em condições de stress metabólico nas larvas, provocado por indução de dieta com restrição lipídica através de um inibidor de lipase pancreática (Tetraolipistatina / Orlistate), observamos o efeito na redução de absorção lipídica sem alteração nos índices nutricionais, pois houve maior ingestão de alimento pela larva como resposta compensatória ao déficit energético causado pelo fármaco. Nessa condição, o gene *TcACBP6* apresentou aumento significativo da expressão em resposta a redução na digestão de TAG da dieta e bloqueio da síntese *de novo* observada

pelo efeito da Tetraidrolipistatina, o que aparentemente impulsionou as vias endógenas de mobilização de ácidos graxos a partir do TAG estocado no corpo gorduroso por lipólise, que se complementa com o efeito reduzido da eficiência de conversão de alimento ingerido, exigindo maior necessidade de lipólise.

Além disso, as vias de regulação da ingestão de alimento que envolve a expressão de sulfakininas e peptídeos semelhantes à insulina também foram caracterizadas, indicando maior sensibilidade dos tecidos das larvas à insulina, sendo necessário menor concentração de ILP 1 e 2 e do respectivo receptor (InR) para manutenção da homeostase, além da redução na expressão de sulfakininas fornecendo o indicativo de necessidade de maior consumo.

Em contra partida, as larvas induzidas em alimentação com alto teor de gordura condicionou a expressão de *TcACBP6* em níveis mais reduzidos. Com isso, observamos até o presente estudo a ação de *TcACBP6* voltada para os processos lipolíticos da célula e portanto apresentando expressão reduzida na condição de alimentação contínua com alto teor de gordura e estímulos lipogênicos. Em corroboração, verificamos que não houve resposta na expressão do gene para o receptor de insulina e não houve alteração no conteúdo de açúcares totais, supondo que podem não haver aumento da expressão de insulina e por isso não haver resposta significativa de *TcasInR*. Contudo o sistema de regulação da insulina em insetos ainda é bastante complexo e se faz necessário conduzir melhor esses resultados nessas condições.

Ao fim, a inibição da expressão de *TcACBP6* conduzida por RNAi, sustentou a hipótese da sua ação no transporte e liberação de acil CoA de cadeia longa para a via da β oxidação. Porém, sugerimos que há redução da lipogênese no CG provocado pelo silenciamento, o que ocasionou redução no conteúdo de TAG e formação alterada de gotículas lipídicas analisado por microscopia.

Referências bibliográficas

AHN, M. Y. et al. Gene expression profiling and inhibition of adipose tissue accumulation of *G. bimaculatus* extract in rats on high fat diet. **Lipids in Health and Disease**, p. 1–15, 2015.

AHN, M. Y. et al. Antilipidemic effects and gene expression profiling of the glycosaminoglycans from cricket in rats on a high fat diet. **Archives of Pharmacal Research**, v. 39, n. 7, p. 926–936, 2016.

ALABASTER, A. et al. Deficiencies in acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase 1 differentially affect eggshell formation and blood meal digestion in *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 12, p. 946–955, 2011.

ALVES-BEZERRA, M. et al. Serotonin regulates an acyl-CoA-binding protein (ACBP) gene expression in the midgut of *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, p. 119–125, 2010a.

ALVES-BEZERRA, M. et al. Serotonin regulates an acyl-CoA-binding protein (ACBP) gene expression in the midgut of *Rhodnius prolixus*. v. 40, p. 119–125, 2010b.

ALVES-BEZERRA, M. et al. Adipokinetic hormone receptor gene identification and its role in triacylglycerol metabolism in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 69, p. 51–60, 2016.

ALVES-BEZERRA, M. et al. Deficiency of glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 decreases triacylglycerol storage and induces fatty acid oxidation in insect fat body. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1862, n. 3, p. 324–336, 2017.

ALVES-BEZERRA, M.; GONDIM, K. C. Triacylglycerol biosynthesis occurs via the glycerol-3-phosphate pathway in the insect *Rhodnius prolixus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1821, n. 12, p. 1462–1471, 2012.

AOYAMA, H. et al. Proteínas tirosina fosfatases: Propriedades e funções biológicas. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 896–900, 2003.

ARRESE, E. L. et al. Lipid storage and mobilization in insects : current status and future directions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, p. 7–17, 2001.

ARRESE, E. L.; ROJAS-RIVAS, B. I.; WELLS, M. A. Synthesis of sn-1,2-diacylglycerols by monoacylglycerol acyltransferase from *Manduca sexta* fat body. **Insect biochemistry and physiology**, v. 31, n. 3, p. 325–335, 1996.

ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect Fat Body : Energy , Metabolism , and Regulation. **Annual Review of Entomology**, n. 55, p. 207–228, 2010.

ARRESE, E. L.; WELLS, M. A. Purification and properties of a phosphorylatable triacylglycerol lipase from the fat body of an insect , *Manduca sexta*. **Journal of Lipid Research**, v. 35, p. 1652–1660, 1994.

APELLA, G.C.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. C. Metabolismo de Lipídeos. In: **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. RJ: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCT, 2012. p. 170–191.

ATHENSTAEDT, K.; DAUM, G. The life cycle of neutral lipids: Synthesis, storage and degradation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 12, p. 1355–1369, 2006.

AUERSWALD, L.; SIEGERT, K. J.; GÄDE, G. Activation of triacylglycerol lipase in the fat body of a beetle by adipokinetic hormone. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 5, p. 461–470, 2005.

AZZAZY, H. M. E.; PELSERS, M. M. A. L.; CHRISTENSON, R. H. Unbound Free Fatty Acids and Heart-Type Fatty Acid – Binding Protein : Diagnostic Assays and Clinical Applications. **Clinical Chemistry**, v. 29, p. 19–29, 2006.

BALDWIN, R.; FASULO, T. Confused Flour Beetle, *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae) and Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst)(Insecta: **University of Florida IFAS Extension**, p. 1–6, 2003.

BAUERFEIND, S. S. et al. Effects of adult nutrition on female reproduction in a fruit-feeding butterfly : The role of fruit decay and dietary lipids. **Journal of Insect Physiology** **53**, v. 53, p. 964–973, 2007.

BENSAAD, K. et al. Fatty acid uptake and lipid storage induced by HIF-1 α contribute to cell growth and survival after hypoxia-reoxygenation. **Cell Reports**, v. 9, n. 1, p. 349–365, 2014.

BENTON, M. A.; PAVLOPOULOS, A. May the force be with you. v. 4, n. 1, p. 16–21, 2014.

BOND, N. D.; HOSHIZAKI, D. K.; GIBBS, A. G. The role of 20-hydroxyecdysone signaling in *Drosophila* pupal metabolism. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 157, n. 4, p. 398–404, 2010.

BROWN, S. J. et al. The red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera): A model for studies of development and pest biology. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 4, n. 8, 2009.

BURTON, M. et al. Evolution of the acyl-CoA binding protein (ACBP). **Biochemical Journal**, v. 392, n. 2, p. 299–307, 2005.

CANAVOSO, E. et al. FAT METABOLISM IN INSECTS. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 21, p. 23–46, 2001.

CANAVOSO, E. Ã.; FREDE, S.; RUBIOLO, E. R. Metabolic pathways for dietary lipids in the midgut of hematophagous *Panstrongylus megistus* (Hemiptera : Reduviidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 845–854, 2004.

CANAVOSO, L. E.; WELLS, M. A. Metabolic pathways for diacylglycerol biosynthesis and release in the midgut of larval *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p. 1173–1180, 2000.

- CARVALHO, M. et al. Effects of diet and development on the Drosophila lipidome. **Molecular Systems Biology**, v. 8, n. 600, p. 1–17, 2012.
- CHARMPILAS, N. et al. Acyl-CoA-binding protein (ACBP): a phylogenetically conserved appetite stimulator. **Cell Death and Disease**, v. 11, n. 1, 2020.
- CHEN, Z. -W et al. Isolation and characterization of porcine diazepam-binding inhibitor, a polypeptide not only of cerebral occurrence but also common in intestinal tissues and with effects on regulation of insulin release. **European Journal of Biochemistry**, v. 174, n. 2, p. 239–244, 1988.
- CHERNIACK, E. P. Bugs as Drugs, Part 1: Insects. The “New” Alternative Medicine for the 21st Century? **Alternative Medicine Review**, v. 15, n. 2, p. 124–135, 2010.
- CHOI, S.-J.; HWANG, J.-M.; KIM, S.-I. A Colorimetric Microplate Assay Method for High Throughput Analysis of Lipase Activity. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 4, p. 417–420, 2003.
- CHOWANSKI, S. et al. Insect Peptides - Perspectives in Human Diseases Treatment . **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 29, 2017.
- CONSTANTINIDES, P. P.; STEIM, J. M. Physical properties of fatty acyl-CoA. Critical micelle concentrations and micellar size and shape. **J Biol Chem**, v. 260, 1985.
- CONSTANTINIDES, P. P.; STEIM, J. M. Micellization of fatty acyl-CoA mixtures and its relevance to the fatty acyl selectivity of acyltransferases. **Arch Biochem Biophys**, v. 261, 1988.
- COSTABEL, M. D. et al. Structure of armadillo ACBP : a new member of the acyl-CoA-binding protein family. **protein structure communications Acta**, n. July, p. 958–961, 2006.
- CZAJA, M. J. JNK regulation of hepatic manifestations of the metabolic syndrome. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 21, n. 12, 2010.
- DAVIS, B. M.; RICHENS, J. L.; O’SHEA, P. Label-free critical micelle concentration determination of bacterial quorum sensing molecules. **Biophys J**, v. 101, 2011.
- DEFFERRARI, M. S.; ORCHARD, I.; LANGE, A. B. Identification of the first insulin-like peptide in the disease vector *Rhodnius prolixus*: Involvement in metabolic homeostasis of lipids and carbohydrates. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 70, p. 148–159, 2016.
- DEW-BUDD, K.; JARNIGAN, J.; REED, L. K. Genetic and Sex-Specific Transgenerational Effects of a High Fat Diet in *Drosophila melanogaster*. **PLOS ONE**, p. 1–20, 2016.
- DIOP, S. B.; BIRSE, R. T.; BODMER, R. High Fat Diet Feeding and High Throughput Triacylglyceride Assay in *Drosophila Melanogaster*. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 127, 2017.
- DJAWDAN, M. et al. Metabolic Reserves and Evolved Stress Resistance in *Drosophila melanogaster*. **Physiological Zoology**, v. 71, n. 5, p. 584–594, 1998.

DOANE, W. W. Developmental physiology of the mutant female sterile(2)adipose of *Drosophila melanogaster*. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 146, p. 275–298, 1961.

DOURLEN, P. et al. Progress in Lipid Research Fatty acid transport proteins in disease : New insights from invertebrate models. **JPLR**, v. 60, p. 30–40, 2015.

ELLE, I. C. et al. Tissue- and paralogue-specific functions of acyl-CoA-binding proteins in lipid metabolism in *Caenorhabditis elegans*. **Biochem. J.**, v. 437, p. 231–241, 2011.

ELLIS, B. A. et al. Long-chain acyl-CoA esters as indicators of lipid metabolism and insulin sensitivity in rat and human muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 279, p. 554–560, 2000.

EMBRAPA. Características gerais das espécies. **Documento Embrapa Nº 75**, p. 1–7, 2006.

ENTRINGER, P. F. et al. Interaction of lipophorin with *Rhodnius prolixus* oocytes: Biochemical properties and the importance of blood feeding. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 7, p. 836–844, 2013.

ERNST, U. R. et al. Epigenetics and locust life phase transitions. p. 88–99, 2015.

ESTEVES, A.; EHRLICH, R. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 142, n. 3- 4 SPEC. ISS., p. 262–274, 2006.

FAERGEMAN, N. J. et al. Acyl-CoA binding proteins; structural and functional conservation over 2000 MYA. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 299, n. 1–2, p. 55–65, 2007.

FAERGEMAN, N. J.; KNUDSEN, J. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. **Biochem. J.**, v. 12, p. 1–12, 1997.

FAERGEMAN, N. J.; KNUDSEN, J. Acyl-CoA binding protein is an essential protein in mammalian cell lines. **Biochemical Journal**, v. 368, n. 3, p. 679–682, 2002.

FAKO, V. E.; ZHANG, J.; LIU, J. Mechanism of Orlistat Hydrolysis by the Thioesterase of Human Fatty Acid Synthase. **American Chemical Society**, v. 4, p. 3444–3453, 2014.

FAN, J. et al. Acyl-coenzyme A binding domain containing 3 (ACBD3; PAP7; GCP60): An emerging signaling molecule. **Progress in Lipid Research**, v. 49, n. 3, p. 218–234, 2010.

FRASER, M. J. Insect Transgenesis : Current Applications and Future Prospects. p. 267–291, 2012.

FREIRE, C. C. S. D. **Metabolismo de lipídeos em inseto coleóptero: digestão e transporte de ácidos graxos**. [s.l.] Universidade Federal de Alagoas, 2018.

GAIGG, B. et al. Depletion of acyl-coenzyme A-binding protein affects sphingolipid synthesis and causes vesicle accumulation and membrane defects

- in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular biology of the cell**, v. 12, n. 4, p. 1147–60, 2001.
- GEERINC, K.; FREYOGEL, T. A. LIPASE ACTIVITY AND STIMULATION MECHANISM ESTERASES IN THE MIDGUT OF FEMALE OF. **J. Insect Physiol**, v. 21, 1975.
- GONDIM, K. C. et al. Lipid metabolism in insect disease vectors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 101, n. July, p. 108–123, 2018.
- GREVENGOED, T. J.; KLETT, E. L.; COLEMAN, R. A. Acyl-CoA Metabolism and Partitioning. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 34, p. 1–30, 2014.
- GRILLO, L. A. M. Metabolismo de lipídios no intestino do inseto *Rhodnius prolixus*. **Instituto de Bioquímica Médica**, 2005.
- GRILLO, L. A. M.; MAJEROWICZ, D.; Ñ, K. C. G. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera : Reduviidae): Role of a midgut triacylglycerol-lipase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, p. 579–588, 2007.
- GRILLO, L. A. M.; PONTES, E. G.; GONDIM, K. C. Lipophorin interaction with the midgut of *Rhodnius prolixus*: characterization and changes in binding capacity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, p. 429–438, 2003.
- GRÜNWARD, S. et al. Longevity in the red flour beetle *Tribolium castaneum* is enhanced by broccoli and depends on *nrf-2*, *jnk-1* and *foxo-1* homologous genes. **Genes and Nutrition**, v. 8, n. 5, p. 439–448, 2013.
- GUIDOTTI, A. et al. Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 11, p. 3531–3535, 1983.
- HASELTON, T.; FRIDELL, Y. W. C. Adult *Drosophila melanogaster* as a model for the study of glucose homeostasis. **AGING**, v. 2, n. 8, p. 23–26, 2010.
- HEIER, C.; KÜHNLEIN, R. P. Triacylglycerol Metabolism in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 210, n. December, p. 1163–1184, 2018.
- HEINRICHSEN, E. T. et al. Metabolic and transcriptional response to a high-fat diet in *Drosophila melanogaster*. **Molecular Metabolism**, v. 3, n. 1, p. 42–54, 2014.
- HEINRICHSEN, E. T.; HADDAD, G. G. Role of High-Fat Diet in Stress Response of *Drosophila*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 3–10, 2012.
- HERZIG, K. H. et al. Regulation of the action of the novel cholecystokinin-releasing peptide diazepam binding inhibitor by inhibitory hormones and taurocholate. **Regulatory Peptides**, v. 74, n. 2–3, p. 193–198, 1998.
- HOFFMAN, A. G. D.; DOWNER, R. G. H. End product specificity of triacylglycerol lipases from intestine, fat body, muscle and haemolymph of the American cockroach, *Periplaneta americana* L. **Lipids**, v. 14, n. 11, p. 893–899, 1979a.
- HOFFMAN, A. G. D.; DOWNER, R. G. H. Synthesis of diacylglycerols by monoacylglycerol acyltransferase from crop, midgut and fat body tissues of the

american cockroach, *Periplaneta americana* L. **Insect Biochemistry**, v. 9, n. 2, 1979b.

HU, L. et al. Regulation of lipolytic activity by long-chain acyl-coenzyme A in islets and adipocytes. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 289, n. 6, p. E1085–E1092, 2005.

INSUA, J. L. et al. Modeling *Klebsiella pneumoniae* Pathogenesis by Infection of the Wax Moth *Galleria mellonella*. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 10, p. 3552–3565, 2013.

IRIS, S. et al. Longevity in the red flour beetle *Tribolium castaneum* is enhanced by broccoli and depends on *nrf - 2*, *jnk - 1* and *foxo - 1* homologous genes. **Genes & Nutrition**, p. 439–448, 2013.

JUGUELIN, H.; BESSOULE, J. J.; CASSAGNE, C. Interaction of amphiphilic substrates (acyl-CoAs) and their metabolites (free fatty acids) with microsomes from mouse sciatic nerves. **BBA - Biomembranes**, v. 1068, n. 1, p. 41–51, 1991.

KNUDSEN, J. et al. Acyl-CoA-binding protein in the rat. **Biochem. J.**, v. 262, p. 513–519, 1989.

KNUDSEN, J. Acyl-CoA-binding protein (ACBP) and its relation to fatty acid-binding protein (FABP): an overview. **Molecular and Cellular Biochemistry**, p. 217–223, 1990.

KNUDSEN, J. et al. Yeast acyl-CoA-binding protein: Acyl-CoA-binding affinity and effect on intracellular acyl-CoA pool size. **Biochemical Journal**, v. 302, n. 2, p. 479–485, 1994.

KNUDSEN, J. et al. Role of Acyl-CoA Binding Protein in Acyl-CoA Metabolism and Acyl-CoA–Mediated Cell Signaling. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 192, n. 2, p. 95–103, 1999.

KNUDSEN, J. et al. Role of Acyl-CoA Binding Protein in Acyl-CoA Metabolism and Acyl-CoA – Mediated Cell Signaling Acyl-CoA binding protein The ACBP protein family . **the journal of nutrition**, v. 130, n. 2, p. 1–19, 2000.

KNUDSEN, J.; BURTON, M.; FÆRGEMAN, N. Long chain acyl-CoA esters and acyl-CoA binding protein (ACBP) in cell function. **Advances in Molecular and Cell Biology**, v. 33, p. 123–152, 2003.

KOLMER, M. et al. Tissue-Specific Expression of the Diazepam-Binding Inhibitor in *Drosophila melanogaster*: Cloning, Structure, and Localization of the Gene. **MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY**, v. 14, n. 10, p. 6983–6995, 1994.

KRAGELUND, B. B. et al. Three-dimensional structure of the complex between acyl-coenzyme A Binding protein and palmitoyl-coenzyme A. **J. Mol. Biol.**, p. 1260–1277, 1993.

KRAGELUND, B. B. et al. Conserved residues and their role in the structure, function, and stability of acyl-coenzyme A binding protein. **Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 2386–2394, 1999.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and**

Evolution, v. 33, p. 1870–1874, 2016.

KUNTE, A. S.; MATTHEWS, K. A.; RAWSON, R. B. Fatty acid auxotrophy in *Drosophila* larvae lacking SREBP. **Cell Metabolism**, v. 3, n. 6, p. 439–448, 2006.

LANDROCK, D. et al. Acyl-CoA binding protein gene ablation induces pre-implantation embryonic lethality in mice. **Lipids**, v. 45, n. 7, p. 567–580, 2010.

LARSEN, M. K. et al. MAA-1, a Novel Acyl-CoA – binding Protein Involved in Endosomal Vesicle Transport in *Caenorhabditis elegans*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 17, n. October, p. 4318–4329, 2006.

LAW, J. H.; RIBEIRO, J. M. C.; WELLS, M. A. Biochemical insights derived from insect diversity. **Annu. Rev. Biochem**, v. 61, 1992.

LEE, L. et al. Loss of the acyl-CoA binding protein (Acbp) results in fatty acid metabolism abnormalities in mouse hair and skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 1, p. 16–23, 2007.

LEHANE, M. J. **The biology of blood-sucking in insects**. 2^a ed. The Edinburgh Building, Cambridge, UK: United States of America by Cambridge University Press, New York, 2005.

LI, H. Y.; CHYE, M. L. Membrane localization of Arabidopsis acyl-CoA binding protein ACBP2. **Plant Molecular Biology**, v. 51, n. 4, p. 483–492, 2003.

LI, L. O.; KLETT, E. L.; COLEMAN, R. A. Acyl-CoA synthesis, lipid metabolism and lipotoxicity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1801, n. 3, p. 246–251, 2010.

LIU, M.; ZHANG, T.; XU, W. A cDNA encoding diazepam-binding inhibitor / acyl-CoA-binding protein in *Helicoverpa armigera*: Molecular characterization and expression analysis associated with pupal diapause. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 141, p. 168–176, 2005.

LIU, Z.; HUANG, X. Lipid metabolism in *Drosophila*: development and disease Using *Drosophila* System to Study Lipid Metabolism Lipids Function in *Drosophila* Early Development. **Acta Biochim Biophys**, v. 45, n. 1, p. 44–50, 2013.

LORENZ, M. W.; ANAND, A. N. Changes in the Biochemical Composition of Fat Body Stores During Adult Development of Female Crickets, *Gryllus bimaculatus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 119, n. February, p. 110–119, 2004.

LU, K. et al. Adipokinetic Hormone Receptor Mediates Trehalose Homeostasis to Promote Vitellogenin Uptake by Oocytes in *Nilaparvata lugens*. **Frontiers on Physiology**, v. 9, n. January, p. 1–12, 2019.

LUDEWIG, A. H. et al. Differential Expression of Alternative Acyl-CoA Binding Protein (ACBP) Transcripts in an Inducible Human Preadipocyte Cell Line. **Horm Metab Res**, v. 43, n. 1, p. 440–442, 2011.

M.T.H. BEENAKKERS, A.; VAN DER HORST, D. J.; VAN MARREWIJK, W. J. A. Insect lipids and lipoproteins, and their role in physiological processes. **Progress in Lipid Research**, v. 24, n. 1, p. 19–67, 1985.

MAJEROWICZ, D. et al. The ACBP gene family in *Rhodnius prolixus*: Expression,

characterization and function of RpACBP-1. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 72, p. 41–52, 2016.

MAJEROWICZ, D. et al. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus*: Lessons from the genome. **Gene**, v. 596, p. 27–44, 2017.

MARCHLER-BAUER, A. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Res.**43, 2015.

MARCHLER-BAUER, A. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. **Nucleic Acids Res.**45, 2017.

MATSUMOTO, S. et al. Characterization of acyl-CoA-binding protein (ACBP) in the pheromone gland of the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, p. 603–609, 2001.

MATSUMOTO, Y. et al. Diabetic silkworms for evaluation of therapeutically effective drugs against type II diabetes. **Nature Publishing Group**, p. 9–16, 2015.

MESQUITA, R. D. et al. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 48, p. 14936–14941, 2015.

MICHELETTO, M. C. et al. International Journal of Biological Macromolecules Lipid membranes and acyl-CoA esters promote opposing effects on acyl-CoA binding protein structure and stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 284–296, 2017.

MOGENSEN, I. B. et al. A novel acyl-CoA-binding protein from bovine liver. Effect on fatty acid synthesis. **Biochemical Journal**, v. 241, n. 1, p. 189–192, 1987.

MONZANI, P. S. et al. A new topology of ACBP from *Moniliophthora perniciosa*. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 1, p. 115–123, 2010.

MORGAN, D. O. **The Cell Cycle: Principles of Control**. [s.l.] New Science Press Ltd, 2007.

MOSAVI, L. K. et al. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. **Protein Science**, p. 1435–1448, 2004.

MOTA, M. P.; FIGUEIREDO, P. A.; DUARTE, J. A. Teorias biológicas do envelhecimento. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v. 4, n. 1, p. 81–110, 2004.

MUKHERJEE, K.; TWYMAN, R. M.; VILCINSKAS, A. Insects as models to study the epigenetic basis of disease. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 118, n. 1–2, p. 69–78, 2015.

NÄSSEL, D. R.; BROECK, J. VANDEN. Insulin/IGF signaling in *Drosophila* and other insects: Factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 2, p. 271–290, 2016.

- NEESS, D. et al. Long-chain acyl-CoA esters in metabolism and signaling: Role of acyl-CoA binding proteins. **Progress in Lipid Research**, v. 59, p. 1–25, 2015.
- NEI, M.; KUMAR, S. Molecular Evolution and Phylogenetics. **Oxford University Press**, 2000.
- NELLIOT, A.; BOND, N.; HOSHIZAKI, D. K. Fat-Body Remodeling in *Drosophila melanogaster*. **genesis**, v. 44, p. 396–400, 2006.
- NIOT, I. et al. Progress in Lipid Research Intestinal absorption of long-chain fatty acids : Evidence and uncertainties. **Progress in Lipid Research**, v. 48, n. 2, p. 101–115, 2009.
- OGIWARA, H. et al. Inhibition of rat-liver acetyl- coenzyme-A carboxylase by palmitoyl-coenzyme A. Formation of equimolar enzyme-inhibitor complex. **Eur J Biochem**, v. 89, 1978.
- OHNISHI, A. et al. Functional Characterization of the *Bombyx mori* Fatty Acid Transport Protein (BmFATP) within the Silkmoth Pheromone Gland *. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 284, n. 8, p. 5128–5136, 2009.
- OHNISHI, A.; HULL, J. J.; MATSUMOTO, S. Targeted disruption of genes in the *Bombyx mori* sex pheromone biosynthetic pathway. **PNAS**, v. 103, n. 12, 2006.
- OIKARI, S. et al. Effect of medium- and long-chain fatty acid diets on PPAR and SREBP-1 expression and glucose homeostasis in ACBP-overexpressing transgenic rats. **Acta Physiol**, v. 194, p. 57–65, 2008.
- ORIEL, C.; LASKO, P. Recent Developments in Using *Drosophila* as a Model for Human Genetic Disease. **Internacional journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, 2018.
- PALANKER, L. et al. *Drosophila* HNF4 Regulates Lipid Mobilization and β -Oxidation. **Cell Metab.**, v. 9, n. 3, p. 228–239, 2010.
- PALANKER MUSSELMAN, L. et al. A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*. **Disease Models & Mechanisms**, v. 4, n. 6, p. 842–849, 2011.
- PATEL, R. T. et al. Activation of the lipid droplet controls the rate of lipolysis of triglycerides in the insect fat body. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 24, p. 22624–22631, 2005.
- PAULA, M. T. DE et al. High-Fat Diet Induces Oxidative Stress and MPK2 and HSP83 Gene Expression in *Drosophila melanogaster*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.
- PAULA, M. T. DE. **ALTERAÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS POR UMA DIETA RICA EM GORDURA EM *Drosophila melanogaster* E OS EFEITOS DA HESPERIDINA**. [s.l.] Universidade Federal do Pampa, 2017.
- PEDIGO, L. P.; RICE, M. E. **Entomology and Pest Management**. sexta ed. [s.l.] Waveland Press, 2014.
- PIPER, M. D. W.; PARTRIDGE, L. Dietary Restriction in *Drosophila* : Delayed Aging or Experimental Artefact ? **PLoS Genetics**, v. 3, n. 4, 2007.

PONNUVEL, K. M. et al. A Lipase Isolated from the Silkworm *Bombyx mori* Shows Antiviral Activity against Nucleopolyhedrovirus. **JOURNAL OF VIROLOGY**, v. 77, n. 19, p. 10725–10729, 2003.

QIAN, S. et al. Cloning and functional characterization of a fatty acid transport protein (FATP) from the pheromone gland of a lichen moth , *Eilema japonica* , which secretes an alkenyl sex pheromone. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 1, p. 22–28, 2011.

RABOANATAHIRY, N. et al. Functional and structural diversity of acyl-coA binding proteins in oil crops. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. MAY, p. 1–21, 2018.

RABOANATAHIRY, N. H. et al. Genome-wide identification and Phylogenic analysis of kelch motif containing ACBP in *Brassica napus*. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–13, 2015.

RASMUSSEN, J. T. et al. Acyl-CoA-binding protein (ACBP) can mediate intermembrane acyl-CoA transport and donate acyl-CoA for β -oxidation and glycerolipid synthesis. **Biochem. J.**, v. 170, p. 165–170, 1994.

RASMUSSEN, J. T.; ROSENDAL, J.; KNUDSEN, J. Interaction of acyl-CoA binding protein (ACBP) on processes for which acyl-CoA is a substrate, product or inhibitor. **Biochemical Journal**, v. 292, n. 3, p. 907–913, 1993.

RATCLIFFE, N. A. et al. Insect natural products and processes : New treatments for human disease. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 10, p. 747–769, 2011.

RICHARDS, S. et al. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. **Nature**, v. 452, n. 7190, p. 949–955, 2008.

ROSE, T. M.; SCHULTZ, E. R.; TODARO, G. J. Molecular cloning of the gene for the yeast homolog (ACB) of diazepam binding inhibitor/endozepine/acyl-CoA-binding protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 23, p. 11287–11291, 1992.

RYLEE, J. C. et al. Expanding the genetic toolkit of *Tribolium castaneum*. **PLOS ONE**, p. 1–11, 2018.

RYUDA, M. et al. Identification of a Novel Gene , Anorexia , Regulating Feeding Activity via Insulin Signaling in *Drosophila melanogaster* □. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 286, n. 44, p. 38417–38426, 2011.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406- 425., 1987.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. December, p. 1–8, 2001.

SANDERS, H. R. et al. Blood meal induces global changes in midgut gene expression in the disease vector, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, n. 11, p. 1105–1122, 2003.

SANTANA, C. C.; BARBOSA, L. A.; DINIZ, I. Lipase Activity in the Larval Midgut of *Rhynchophorus palmarum* : Biochemical Characterization and the Effects of

Reducing Agents. **Insects**, 2017.

SATAPATI, S. et al. Elevated TCA cycle function in the pathology of diet-induced hepatic insulin resistance and fatty liver. **Journal of Lipid Research Volume**, v. 53, 2012.

SAWABE, A. K.; MORIBAYASHI, A. Lipid Utilization for Ovarian Development in an Autogenous Mosquito , *Culex pipiens molestus* (Diptera : Culicidae) Lipid Utilization for Ovarian Development in an Autogenous Mosquito , *Culex pipiens molestus* (Diptera : Culicidae). **BioOne Complete**, v. 37, n. 5, p. 726–731, 2019.

SCHMIDT-OTT, U.; LYNCH, J. A. ScienceDirect Emerging developmental genetic model systems in holometabolous insects. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 39, p. 116–128, 2016.

SCHULTZ, R.; PELTO-HUIKKO, M.; ALHO, H. Expression of diazepam binding inhibitor-like immunoreactivity in rat testis is dependent on pituitary hormones. **Endocrinology**, v. 130, n. 6, p. 3200–32006, 1992.

SEO, M. et al. *Tenebrio molitor* Larvae Inhibit Adipogenesis through AMPK and MAPKs Signaling in 3T3-L1 Adipocytes and Obesity in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 18, n. 518, 2017.

SEO, S. J. et al. Tissue- and Stage-specific Expression of Two Lipophorin Receptor Variants with Seven and Eight Ligand-binding Repeats in the Adult Mosquito. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 43, p. 41954–41962, 2003.

SHENNAN, L. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. **Nucleic Acids Res.**48, 2020.

SIEGLAFF, D. H.; DUNCAN, K. A.; BROWN, M. R. Expression of genes encoding proteins involved in ecdysteroidogenesis in the female mosquito , *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, p. 471–490, 2005.

SILVA, L. B. et al. Biochemical studies of amylase, lipase and protease in *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) populations fed with *Vigna unguiculata* grain cultivated with diazotrophic bacteria strains. **Bulletin of Entomological Research**, p. 1–8, 2017.

SIMON, M. N. Acomodação fenotípica e acomodação genética: evidências e questões não resolvidas em macroevolução. **Revista da Biologia**, v. 6a, p. 1–5, 2010.

SINGARAJA, R. R. et al. HIP14 , a novel ankyrin domain-containing protein , links huntingtin to intracellular trafficking and endocytosis. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 23, p. 2815–2828, 2002.

SITNICK, M.; BODINE, S. C.; RUTLEDGE, J. C. Chronic high fat feeding attenuates load-induced hypertrophy in mice. **J Physiol**, v. 23, p. 5753–5765, 2009.

SMITH, A. F. et al. Two Fatty Acid- binding Proteins from the Midgut of *Manduca sexta* Larvae *. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 267, n. 1, p. 380–384, 1992.

SNYDER, M. J.; ANTWERPEN, R. VAN. Cellular distribution , levels , and function of the diazepam-binding inhibitor / acyl-CoA-binding protein in last instar *Manduca sexta* midgut. **Cell Tissue Res**, p. 177–184, 1997.

SNYDER, M. J.; FEYEREISEN, R. diazepam binding inhibitor (DBI) homolog from the tobacco hornworm ,. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 94, 1993.

SONG, WEI; VEENSTRA, JAN A.; PERRIMON, N. Control of lipid metabolism by Tachykinin in *Drosophila*. **Cell Rep.**, v. 9, n. 1, p. 40–47, 2015.

STEELE, J. E. GLYCOGEN PHOSPHORYLASE IN INSECTS. **Insect Biochemistry**, v. 12, n. 2, p. 131–147, 1982.

TAJIMA, F.; NEI, M. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. 1984.

TASKINEN, J. P. et al. High Resolution Crystal Structures of Unliganded and Liganded Human Liver ACBP Reveal a New Mode of Binding for the Acyl-CoA Ligand. **PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 66, p. 229–238, 2007.

TEILUM, K. et al. Different secondary structure elements as scaffolds for protein folding transition states of two homologous four-helix bundles. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 59, n. 1, p. 80–90, 2005.

TOMOYASU, Y.; DENELL, R. E. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. **Development Genes and Evolution**, v. 214, n. 11, p. 575–578, 2004.

TOYE, A. A.; DUMAS, M. E.; BLANCHER, C. Subtle metabolic and liver gene transcriptional changes underlie diet-induced fatty liver susceptibility in insulin-resistant mice. **Diabetologia**, p. 1867–1879, 2007.

TSUCHIDA, K.; WELLS, M. A. Digestion, absorption, transport and storage of fat during the last larval stadium of *Manduca sexta*. Changes in the role of lipophorin in the delivery of dietary lipid to the fat body. **Insect Biochemistry**, v. 18, n. 3, p. 263–268, 1988.

TURUNEN, S.; CRAILSHEIM, K. Lipid and sugar absorption. In: LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. (Eds.). **Biology of insect midgut**. London: Chapman and Hall, 1996.

VAN AALTEN, D. M. F. et al. Binding site differences revealed by crystal structures of *Plasmodium falciparum* and bovine acyl-CoA binding protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 309, n. 1, p. 181–192, 2001.

VAN DER HORST, D. J.; RODENBURG, K. W. Locust flight activity as a model for hormonal regulation of lipid mobilization and transport. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 8, p. 844–853, 2010.

WELTE, M. A. Review Expanding Roles for Lipid Droplets. **Current Biology**, v. 25, n. 11, p. R470–R481, 2015.

WELTE, M. A.; GOULD, A. P. Lipid droplet functions beyond energy storage ☆. **BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1862, n. 10, p. 1260–1272,

2017.

WENDEL, A. A. et al. Glycerol-3-phosphate Acyltransferase (GPAT) -1 , but Not GPAT4 , Incorporates Newly Synthesized Fatty Acids into Triacylglycerol and Diminishes Fatty Acid Oxidation *. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 288, n. 38, p. 27299–27306, 2013.

XIE, Y. S.; BODNARYK, R. P.; FIELDS, P. G. **A rapid and simple flour-disk bioassay for testing substances active against stored-product insects** *Canadian Entomologist*, 1996.

YANAGIBASHI, K. et al. The regulation of intracellular transport of cholesterol in bovine adrenal cells: Purification of a novel protein. **Endocrinology**, v. 123, n. 4, p. 2075–2082, 1988.

ZENG, B.; CAI, X.; ZHU, G. Functional characterization of a fatty acyl-CoA-binding protein (ACBP) from the apicomplexan *Cryptosporidium parvum*. **Microbiology**, v. 152, n. 8, p. 2355–2363, 2006.

ZHENG, H.; YANG, X.; XI, Y. Fat body remodeling and homeostasis control in *Drosophila*. **Life Sciences**, v. 167, p. 22–31, 2016.

ZHENG, J.; II, R. M.; HELFAND, S. L. Calorie restriction delays lipid oxidative damage in *Drosophila melanogaster*. **Ageing Cell**, n. May, p. 209–216, 2005.

ZIEGLER, R. Changes in lipid and carbohydrate metabolism during starvation in adult *Manduca sexta*. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 161, n. 2, p. 125–131, 1991.

ZIEGLER, R.; IBRAHIM, M. M. Formation of lipid reserves in fat body and eggs of the yellow fever mosquito , *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, p. 623–627, 2001.